

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006163

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-106315
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 6 3 1 5

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 6 3 1 5

出 願 人
Applicant(s): 第一製薬株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	NP04-1026
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61P 35/00 C12N 15/09 A01K 67/27
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都多摩市貝取1 4 9 3－1 シャロンパーク永山6 0 4
【氏名】	秋山 徹
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都北区西ヶ原2－2 0－7－1 0 5
【氏名】	石田尾 武文
【発明者】	
【住所又は居所】	新潟県新井市中央町1 0－9
【氏名】	相羽 智生
【特許出願人】	
【識別番号】	000002831
【氏名又は名称】	第一製薬株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100088904
【弁理士】	
【氏名又は名称】	庄司 隆
【電話番号】	03-3864-6572
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	067070
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤。

【請求項 2】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g の発現増強剤および／または機能増強剤である請求項 1 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 3】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つである請求項 1 に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 4】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の抗腫瘍剤。

【請求項 5】

D1g (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含む sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤。

【請求項 6】

D1g (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つである請求項 5 に記載の sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤。

【請求項 7】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 5 または 6 に記載の sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤。

【請求項 8】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 9】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g の発現増強剤および／または機能増強剤である請求項 8 に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 10】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つである請求項 8 に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 11】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 12】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法。

【請求項 13】

D1g の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする、請求項 12 に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 14】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 12 に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 15】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 12 から 14 のいずれか 1 項に記載の腫瘍形成阻害方法。

【請求項 16】

D1g (discs large) の発現および／または機能を増強することを特徴とする、sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 17】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 16 に記載の sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 18】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 16 または 17 に記載の sFRP の発現増強方法および／または機能増強方法。

【請求項 19】

D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 20】

D1g (discs large) の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする請求項 19 に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 21】

D1g (discs large)、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含有する組換えベクターのうちの少なくとも 1 つを用いることを特徴とする請求項 19 に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 22】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 19 から 21 のいずれか 1 項に記載の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 23】

D1g (discs large) 対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) 腫瘍形成を阻害する化合物、

(ii) D1g の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、および

(iii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物。

【請求項 24】

Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) Dlg の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

(ii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

および

(iii) sFRP のメチル化を阻害する作用および／または脱メチル化する作用を有する化合物。

【請求項 25】

sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2 である請求項 23 または 24 に記載の化合物の同定方法。

【請求項 26】

Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物。

【請求項 27】

Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞。

【請求項 28】

被検組織または被検細胞中の Dlg (discs large) 遺伝子および／または Dlg の発現および／または機能を測定し、正常組織または正常細胞と比較して該発現および／または該機能の低下または消失を検出することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 s F R P 発現増強剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、D1g (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤に関する。また、D1gの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤に関する。さらに、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤に関する。また、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法に関する。さらに、D1gの発現および／または機能を増強することを特徴とする、sFRPの発現増強方法および／または機能増強方法に関する。また、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法に関する。さらに、D1g対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、化合物の同定方法に関する。また、D1g対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、化合物の同定方法に関する。さらに、D1g対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物に関する。また、該非ヒト哺乳動物由来の細胞に関する。さらに、D1g遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を測定することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

D1g (discs large) 遺伝子は、数々の組織や細胞で普遍的に発現が認められている遺伝子である。D1g遺伝子によりコードされる蛋白質（以下、D1gと呼称する）は、APC (adenomatous polyposis coli) のC末端XVTモチーフに結合することが報告されている（非特許文献1）。APC遺伝子は、家族性腺腫性ポリポーシス (familial adenomatous polyposis: FAP) の原因遺伝子として単離された。APC遺伝子はFAPだけでなく、散发性の大腸癌についても多数の症例でその異常が検出されている。このことから、APC遺伝子の異常は大腸癌発症の重要な要因であると考えられる。APC遺伝子によりコードされる蛋白質（以下、APCと呼称する）は300kDaの巨大な蛋白質で、 β -カテニンと複合体を形成し、Wnt/Winglessシグナル（以下、Wntシグナルと呼称する）伝達経路を負に制御している。また、APCの過剰発現は細胞周期の進行を阻害する。D1gとAPCの発現がラット大腸上皮細胞および培養海馬ニューロンのシナプスで共に認められたことから、D1gとAPCの複合体は、細胞周期の進行およびニューロン機能に寄与していると考えられる。

【0003】

Wntシグナルは、形態形成を制御する情報伝達系として見出され、発生、幹細胞分化制御および細胞癌化等の様々な現象に関わることが知られている。最近、Wntシグナルが、幹細胞の増殖調節および生存に重要な因子であることが報告された（非特許文献2および3）。Wntシグナルは、Wntリガンドにより細胞膜上に存在するフリズドメンブレンレセプター (frizzled membrane receptor; 以下、Fzと略称する) を介して伝達される。近年、FzおよびWntに結合する分泌化フリズド関連蛋白質 (secreted frizzled-related proteins; 以下、sFRPと略称する) が見い出された（非特許文献4）。sFRPは細胞外においてFzおよびWntに結合して、Wntシグナルのアンタゴニストとして作用し、Wntシグナルの調節に関わっていると考えられる（非特許文献5）。また、sFRPの機能を大腸癌細胞において回復させることにより該細胞内のWntシグナルが低減されたこと、および大腸癌細胞においてはsFRP遺伝子のメチル化によりsFRPの機能が低下

していることが報告されている（非特許文献6）。

【0004】

【非特許文献1】マツミネ（Matsumine, A）ら、「サイエンス（Science）」、1996年、第272巻、p. 1020-1023。

【非特許文献2】ウィラート（Willeert, K）ら、「ネイチャー（Nature）」、2003年、第423巻、p. 448-452。

【非特許文献3】ルヤ（Reya, T）ら、「ネイチャー（Nature）」、2003年、第423巻、p. 409-414。

【非特許文献4】カワノ（Kawano, Y）ら、「ジャーナル オブ セル サイエンス（Journal of Cell Science）」、2003年、第116巻、p. 2627-2634。

【非特許文献5】ジョーンズ（Jones, S. E.）ら、「バイオエッセイズ（BioEssays）」、2002年、第24巻、p. 811-820。

【非特許文献6】スズキ（Suzuki, H）ら、「ネイチャー ジェネティクス（Nature Genetics）」、2004年3月14日オンライン公開。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

D1g 遺伝子は、ショウジョウバエにおいてその欠損により神経芽細胞腫を形成することが報告されていることから、癌抑制遺伝子であると考えられている。また、D1g が APC と結合することや、APC が腫瘍形成に関わる Wnt シグナルの調節に関与していることから、D1g の Wnt シグナルへの関与が考えられる。しかしながら、哺乳動物において D1g 遺伝子が癌抑制遺伝子として作用することを明らかにした報告はない。また、D1g の Wnt シグナルへの関与についての報告もない。

【0006】

D1g の作用およびその作用メカニズムを哺乳動物において明らかにし、その作用を調節する手段を提供することは、D1g 遺伝子、D1g およびこれらの発現や機能の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段の開発に有用である。

【0007】

本発明においては、D1g の作用を調節する手段の提供を課題とする。また、D1g 遺伝子の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、D1g 遺伝子ノックアウトマウスを遺伝子工学的手法により作製した。そして、D1g 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて腫瘍が形成されること、および腫瘍形成に D1g 遺伝子欠損が重要な因子であることを見出した。さらに、D1g 遺伝子欠損により、sFRP1 遺伝子および sFRP2 遺伝子の転写が低減することを見出し、これら知見により本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、

1. D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤、

2. D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g の発現増強剤および／または機能増強剤である前記1. の抗腫瘍剤、

3. D1g (discs large) による sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、D1g、D1g 遺伝子および D1g 遺伝子を含む組換えベクタ

一のうちの少なくとも1つである前記1. の抗腫瘍剤、

4. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記1. から3. のいずれかの抗腫瘍剤、

5. Dlg (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤、

6. Dlg (discs large) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物が、Dlg、Dlg遺伝子およびDlg遺伝子を含む組換えベクターのうちの少なくとも1つである前記5. のsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強剤および／または機能増強剤、

7. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記5. または6. のsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、

8. Dlg (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

9. Dlg (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、Dlgの発現増強剤および／または機能増強剤である前記8. の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

10. Dlg (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物が、Dlg、Dlg遺伝子およびDlg遺伝子を含む組換えベクターのうちの少なくとも1つである前記8. の腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

11. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記8. から10. のいずれかの腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤、

12. Dlg (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法、

13. Dlgの発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする、前記12. の腫瘍形成阻害方法、

14. Dlg (discs large)、Dlg遺伝子およびDlg遺伝子を含む組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記12. の腫瘍形成阻害方法、

15. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記12. から14. のいずれかの腫瘍形成阻害方法、

16. Dlg (discs large) の発現および／または機能を増強することを特徴とする、sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法、

17. Dlg (discs large)、Dlg遺伝子およびDlg遺伝子を含む組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記16. のsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現増強方法および／または機能増強方法、

18. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記16. または17. のsFRPの発現増強方法および／または機能増強方法、

19. Dlg (discs large) によるsFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を、増強することを特徴とする、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

20. Dlg (discs large) の発現増強剤および／または機能増強剤を用いることを特徴とする前記19. の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

21. Dlg (discs large)、Dlg 遺伝子および Dlg 遺伝子を含む組換えベクターのうちの少なくとも1つを用いることを特徴とする前記19. の腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

22. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記19. から21. のいずれかの腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法、

23. Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方が欠損した非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) 腫瘍形成を阻害する化合物、

(ii) Dlg の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、
および

(iii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

24. Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることを特徴とする、下記いずれかの化合物の同定方法；

(i) Dlg の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、

(ii) sFRP (secreted frizzled-related protein) の発現および／または機能を増強する作用を有する化合物、
および

(iii) sFRP のメチル化を阻害する作用および／または脱メチル化する作用を有する化合物、

25. sFRP (secreted frizzled-related protein) が、sFRP 2である前記23. または24. の化合物の同定方法、

26. Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物、

27. Dlg (discs large) 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物由来の細胞、

28. 被検組織または被検細胞中の Dlg (discs large) 遺伝子および／または Dlg の発現および／または機能を測定し、正常組織または正常細胞と比較して該発現および／または該機能の低下または消失を検出することを特徴とする、腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法、

に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、抗腫瘍剤、sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤の提供が可能である。これら薬剤を用いて腫瘍疾患の防止および治療が達成できる。該抗腫瘍剤並びに sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤は、Dlg による sFRP の発現および／または機能のメカニズム解明並びに Dlg の欠損による腫瘍形成のメカニズム解明に利用できる。また、本発明において提供する Dlg 欠損非ヒト哺乳動物および該哺乳動物由来の細胞の使用により、抗腫瘍剤、sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤、sFRP 遺伝子のメチル化阻害剤および／または脱メチル化剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤に用い得る化合物の同定方法が実施可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本発明においては、Dlg 遺伝子ノックアウトマウスを遺伝子工学的手法により作製した（実施例1参照）。そして、Dlg の発現低下および／または機能低下が腫瘍形成の重

要な要因であることを、哺乳動物において初めて明らかにした。

【0012】

本明細書および特許請求の範囲において、「D1g 遺伝子ノックアウトマウス」とは、個体においてD1g 遺伝子のみを欠損させたマウスをいう。「D1g」とは、D1g 蛋白質を意味し、「D1g 遺伝子」とは、D1g をコードする遺伝子を指す。「D1g の発現」とは、D1g をコードするDNAの遺伝子情報がmRNA (D1g mRNA) に転写されること、または、mRNA に転写され、かつ蛋白質 (D1g) のアミノ酸配列として翻訳されることをいう。

【0013】

D1g 遺伝子ノックアウトマウスのうち、D1g 遺伝子ホモ欠損マウス（以下、D1g -/-マウスと呼称する）は、生後短期間で死亡するために成熟マウスを得られなかったが、胚および新生児マウスが得られた。D1g -/-マウスでは、D1g が検出されなかった。D1g -/-マウスでは、D1g 対立遺伝子の両方が欠損していることにより、D1g 遺伝子の転写が起きず、その結果、D1g のアミノ酸配列が翻訳されない。D1g が発現されないことから、D1g -/-マウスでは、D1g の機能は消失している。一方、D1g 遺伝子ヘテロ欠損マウス（以下、D1g +/-マウスと呼称する）については、胚、新生児マウスおよび成熟マウスが得られた。D1g +/-マウスでは、D1g が検出されたが、その量は野生型マウス（以下、D1g ++マウスと呼称する）と比較して少なかった。

【0014】

D1g +/-マウスにおいては、成長に伴って、皮膚腫瘍およびナチュラルキラーリンパ腫の形成が認められた。形成された腫瘍を含む皮膚組織において、正常筋細胞でD1g が検出されたが、腫瘍細胞ではD1g が検出されなかった。このことから、D1g +/-マウスにおける腫瘍形成は、D1g 遺伝子の欠損によるD1g の発現低下および／または機能低下に起因すると考えられる。あるいは、該マウスにおいては対立遺伝子の一方が欠損していることにより、成熟過程でD1g 遺伝子の自然変異誘発等が起こり易く、そのためD1g の発現異常が生じて腫瘍が形成される可能性も考えられる。

【0015】

また、D1g -/-マウスから採取したマウス胚性線維芽細胞（以下、MEF と略称する）において、sFRP1 mRNA および sFRP2 mRNA の減少が認められた。特に sFRP2 mRNA が著しく減少していた。D1g -/-マウス由来のMEF にD1g 遺伝子を導入して発現させると、sFRP2 mRNA が増加することが判明した。このことから、D1g -/-マウス由来のMEF におけるmRNA の減少は、D1g 遺伝子の欠損によると考える。mRNA の減少は、mRNA から翻訳されて生じる蛋白質の減少を惹き起こし、その結果、生体内における該蛋白質の機能も低下させる。これらから、D1g の発現低下および／または機能低下は、sFRP の発現、特に sFRP2 の発現および／または機能の低下を惹き起すと考える。sFRP は、Wnt アンタゴニストとしての機能を有し、Wnt シグナルの調節機能を担っていることが知られている（「ディベロプメント (Development)」、1998年、第125巻、p. 4767-4776；および「ヒューマン モレキュラー ジェネティクス (Human Molecular Genetics)」、1999年、第8巻、p. 575-583）。最近、sFRP2 等のsFRP ファミリーの機能を大腸癌細胞において回復させることにより、Wnt シグナルが低減されることが報告された（スズキ (Suzuki, H) ら、「ネイチャー ジェネティクス (Nature Genetics)」、2004年3月14日オンライン公開）。さらに、この報告においては、sFRP 遺伝子のメチル化が多数の大腸癌組織で認められることを開示している。これらから、大腸癌形成において、sFRP 遺伝子のメチル化によりsFRP の発現および／または機能が低下し、その結果Wnt シグナル伝達経路が活性化するというメカニズムが存在することが示唆された。癌細胞のゲノムDNA中に多くのDNAメチル化が観察されることは既に報告されており、発癌とDNAメチル化との関連性が指摘されている。DNAメチル化は、DNAメチルトランスフェ

ラーゼによりDNA中のシトシン塩基にメチル基が付加されて5-メチルシトシンが生じる反応である。メチル化されたDNAにはメチル化DNAに特異的に結合する蛋白質（MBP蛋白質）が結合し、さらにヒストン脱アセチル化酵素を含む転写リプレッサーとの複合体が形成されてヒストンが脱アセチル化するため、クロマチンの構造変化が起こり転写が抑制される。また、MBP蛋白質の結合により、メチル化DNAからの脱メチル化が妨げられてメチル化状態が維持され、転写が安定的に阻止される。すなわち、DNAメチル化は、遺伝子の転写のスイッチとしての作用を有している。例えば、癌抑制遺伝子がメチル化されると、その転写が抑制されるため、癌遺伝子の転写が惹き起こされる可能性がある。また、通常はメチル化されて転写が抑制されている癌遺伝子のメチル化が解除されると、癌遺伝子の転写が開始される可能性がある。

【0016】

sFRPがWntシグナルの調節機能を担っていることから、D1g遺伝子欠損による腫瘍形成のメカニズムには、D1gの発現低下および／または機能低下により、sFRPの発現および／または機能が阻害され、その結果Wntシグナルが促進されるというカスケードが存在すると考える。すなわち、D1gは、sFRPによって調節されているWntシグナル伝達経路の上流に位置する因子であり、sFRPの発現および／または機能によりWntシグナルを負に調節すると考える。したがって、D1gは、Wntシグナルの活性化による腫瘍形成を阻害すると考える。D1gによるsFRPの発現および／または機能に関わるメカニズムとして、D1gによる、sFRPの発現に参与する転写因子や転写調節因子の調節が考えられる。また、別のメカニズムとして、D1gによる、sFRP遺伝子のメチル化の調節が考えられる。例えば、D1gにより、sFRP遺伝子のメチル化に参与するDNAメチルトランスフェラーゼの作用が阻害され、その結果、sFRPの発現および／または機能が正常な状態に維持されるといったメカニズムが考えられる。

【0017】

このように、D1gの発現低下および／または機能低下により、sFRPの発現および／または機能が阻害され、その結果、Wntシグナルが促進されて腫瘍が形成される。sFRPの発現および／または機能の阻害は、D1gの発現低下および／または該発現低下に起因するD1gの機能低下のみならず、D1g遺伝子の変異や該遺伝子の転写・翻訳過程の異常、あるいは蛋白質修飾過程の異常等に起因するD1gの機能低下によっても惹き起こされる。

【0018】

したがって、D1gによるsFRPの発現および／または機能、好ましくはD1gによるsFRP2の発現および／または機能を、増強することにより、Wntシグナルを介した細胞増殖および腫瘍形成を阻害できると考える。さらには、D1gによるsFRPの発現および／または機能、好ましくはD1gによるsFRP2の発現および／または機能を、増強することにより、Wntシグナルの活性化に起因する疾患、例えば腫瘍疾患の防止および／または治療が可能である。本明細書および特許請求の範囲において、「sFRPの発現」とは、sFRPをコードするDNAの遺伝子情報がmRNA（sFRP mRNA）に転写されること、または、mRNAに転写され、かつ蛋白質（sFRP）のアミノ酸配列として翻訳されることを意味する。「sFRPの機能」としては、例えばWntシグナルアンタゴニストとして、Wntシグナル伝達経路を負に調節する機能が例示できる。「D1gによるsFRPの発現および／または機能を増強する」とは、D1gによるsFRPの発現および／または機能がほとんど認められない状態から、該発現および／または機能が認められる状態に変化させること、並びに該発現および／または機能が認められる状態から、その発現量および／または機能がさらに増加した状態に変化させることのいずれをも意味する。「Wntシグナルの活性化」とは、Wntシグナルの作動の程度が正常な状態と比較して高く変化することをいう。Wntシグナルの作動の程度が高く変化することにより、細胞増殖や腫瘍形成等が惹き起こされる。

【0019】

D1gによるsFRPの発現および／または機能、好ましくはD1gによるsFRP2

の発現および／または機能を、増強することは、例えば、D1gの発現および／または機能を増強することにより実施可能である。D1gの機能としては、sFRPの発現および／または機能に関わるメカニズムの調節作用が挙げられる。例えば、D1gの機能としてsFRP遺伝子の転写因子や転写調節因子の機能の増強や、sFRP遺伝子のメチル化の阻害等が考えられる。D1gの発現および／または機能を増強することにより、sFRP遺伝子の転写因子や転写調節因子の機能の増強またはsFRP遺伝子のメチル化の阻害等を介して、sFRPの発現および／または機能を増強することができる。具体的には、sFRPの発現および／または機能を増強することは、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物により実施可能である。このような化合物として、D1g自体またはD1g遺伝子若しくはD1g遺伝子を含有する組換えベクターを例示できる。あるいはD1gの発現増強剤および／または機能増強剤を用いて実施することができる。D1gによるsFRPの発現を、増強する作用を有する化合物は、後述する化合物の同定方法により、種々の化合物から当該作用を有する化合物を選別することにより取得できる。また、D1gの発現増強剤および／または機能増強剤の有効成分として用い得る化合物は、後述する化合物の同定方法により、種々の化合物からD1gの発現および／または機能を増強する化合物を選別することにより取得できる。このように、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を用いて、sFRPの発現および／または機能を増強することにより、Wntシグナルを介した細胞増殖および腫瘍形成の阻害、腫瘍疾患の防止および／または治療が可能である。

【0020】

本発明においては、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む抗腫瘍剤、D1gの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物を含むsFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強する作用を有する化合物を含む腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤を提供する。以下、本発明において、sFRPとして、好ましくはsFRP2である。また、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍形成阻害方法、D1gの発現および／または機能を増強することを特徴とするsFRPの発現増強方法および／または機能増強方法、D1gによるsFRPの発現および／または機能を、増強することを特徴とする腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法を提供可能である。これら方法は、上記抗腫瘍剤、sFRP発現増強剤および／または機能増強剤、並びに腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤のいずれかを使用して実施可能である。

【0021】

D1gとしては、哺乳動物、例えば、ヒト、マウス、ラット等のあらゆる組織または細胞等に由来する蛋白質が挙げられる。具体的には例えば、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるヒト由来蛋白質、あるいは配列番号4に記載のアミノ酸配列で表わされるマウス由来蛋白質が好ましく例示できる。D1gは配列番号2または4に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質に限定されず、該アミノ酸配列を含む蛋白質、または該アミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列で表される蛋白質であることができる。あるいは、該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸に置換、欠失、付加または挿入等の変異が存するアミノ酸配列で表される蛋白質であり得る。これら蛋白質は、D1gとしての機能を有する蛋白質、例えば、sFRP、好ましくはsFRP2の発現および／または機能を増強することができる蛋白質であることが好ましい。アミノ酸の変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有する蛋白質が、sFRP、好ましくはsFRP2の発現および／または機能を増強することができる限り特に制限されない。かかる変異を有する蛋白質は、天然において例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じたものであってよく、また天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得たものであってよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、公知の遺伝子工学的技術を利用して実施できる。変異の導入において、当該蛋白質の基本的な性質（物性、機能、生理活性または

免疫学的活性等)を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互の置換は容易に想定される。

【0022】

D1gは、D1gの発現が確認されている哺乳動物由来の組織や細胞から、公知の蛋白質精製方法に従って精製することにより取得できる。このような方法においては、まず、哺乳動物由来の組織や細胞をホモジナイズした後に、酸や有機溶媒等で蛋白質の抽出を行なう。次いで、得られた抽出液から、公知の精製法を利用してD1gを単離精製する。単離精製方法としては、例えば硫酸アンモニウム沈殿、限外ろ過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析法等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。好ましくは、D1gまたはその断片を用いて公知の抗体作製法により作製した抗D1g特異的抗体を使用して特異的に吸着する方法が推奨される。具体的には、該抗体を結合させたカラムを利用するアフィニティークロマトグラフィーを用いることが好ましい。また、D1gは、一般的な化学合成法により製造することができる。蛋白質の化学合成方法として、成書(「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年;および「ペプチド シンテシス(Peptide Synthesis)」、インターサイエンス(Interscience)、ニューヨーク(New York)、1996年)に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、例えば、固相合成方法、液相合成方法等が知られているがいずれも利用可能である。かかる蛋白質合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させて鎖を延長させていくいわゆるステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメントコンデンセーション法とを包含する。D1gの合成は、そのいずれによっても行うことができる。上記蛋白質合成法において利用される縮合法も常法に従うことができる。縮合法として、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンアミド、N-ヒドロキシ-5-ホルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)法、ウッドワード法等が例示できる。化学合成により得られるD1gはさらに、上記のような慣用の各種精製方法により適宜精製を行うことができる。あるいは、D1gは、D1g遺伝子の塩基配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法(村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社;エールリッヒ(Ehrlich, H. A.)編、「PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用」、1989年、ストックトンプレス;およびウルマー(Ulmer, K. M.)、「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671等を参照)により取得可能である。例えば、D1g遺伝子を含有する組換えベクターを導入した形質転換体を用いてD1gの発現誘導を行い、その後該形質転換体からD1gを回収することにより、D1gを取得できる。さらに、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、上記単離精製方法によりD1gを精製することができる。D1g遺伝子を含有する組換えベクターを導入した形質転換体において、D1gが形質転換体の細胞内あるいは細胞膜上に発現する場合には、形質転換体を破碎してD1gを抽出する。D1gが形質転換体外に分泌される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離処理等により形質転換体を除去した培養液を用いる。さらに、所望により、形質転換体を培養した培養液または形質転換体から、上記単離精製方法によりD1gを精製することができる。また、D1g遺伝子を導入した組換えベクターを用いて、公知の無細胞蛋白質発現系を用いて、D1gを得ることもできる(マディン(Madin, K.)ら、「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ(Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2000年、第97巻、p. 559-564)。

【0023】

D1g 遺伝子は、D1g の発現が確認されている適当な起源から、常法に従って cDNA ライブラリーを調製し、該 cDNA ライブラリーから所望のクローンを選択することにより取得可能である。cDNA の起源としては、D1g の発現が確認されている各種の細胞や組織、またはこれらに由来する培養細胞を例示できる。D1g は種々の組織や細胞で普遍的に発現しているため、cDNA の起源として様々な組織や細胞を使用できる。好ましくは、脳組織、皮膚組織または大腸組織等、あるいはこれら組織由来の細胞等が例示できる。これら起源から cDNA ライブラリーを調製するための全 RNA の分離、mRNA の分離や精製、cDNA の取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施可能である。また、ヒトの脳、胎児脳および脳海馬由来の市販されている polyA⁺RNA から cDNA ライブラリーを構築して用いることもできる。cDNA ライブラリーから所望のクローンを選択する方法も特に制限されず、慣用の方法を利用できる。例えば、D1g 遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプローブやプライマー等を用いて所望のクローンを選択することができる。具体的には、D1g 遺伝子に選択的にハイブリダイゼーションするプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法等やこれらを組合せた方法等を例示できる。ここで用いるプローブやプライマーとしては、D1g 遺伝子の配列情報に基づいて化学合成したポリヌクレオチド等が一般的に使用できる。D1g 遺伝子として具体的には例えば、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列で表されるヒト由来 DNA、または配列番号 3 に記載の塩基配列で表わされるマウス由来 DNA が好ましく例示できる。D1g 遺伝子は配列番号 1 または 3 に記載の塩基配列で表される DNA に限定されず、該 DNA を含む DNA、または該 DNA と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する DNA であることができる。あるいは、該塩基配列において 1 個以上、例えば 1 乃至 100 個、好ましくは 1 乃至 30 個、より好ましくは 1 乃至 20 個、さらに好ましくは 1 乃至 10 個、特に好ましくは 1 乃至数個のヌクレオチドの欠失、置換、付加または挿入といった変異が存する塩基配列またはその相補的塩基配列で表わされる DNA が包含される。変異の程度およびそれらの位置等は、該変異を有する DNA が sFRP の発現および／または機能を増強する機能を有する蛋白質をコードする DNA である限り特に制限されない。かかる変異を有する DNA は、天然に存在する DNA であってよく、誘発変異を有する DNA であってよい。また、天然由来の遺伝子に基づいて変異を導入して得た DNA であってもよい。変異を導入する方法は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法または PCR 等を、単独でまたは適宜組合せて用いることができる。例えば成書に記載の方法〔村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988 年、丸善株式会社；およびエールリッヒ (Ehrlich, H. A.) 編、「PCR テクノロジー、DNA 増幅の原理と応用」、1989 年、ストックトンプレス〕に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術〔ウルマー (Ulmer, K. M.)、「サイエンス (Science)」、1983 年、第 219 巻、p. 666-671〕を利用することもできる。

【0024】

D1g 遺伝子を含有する組換えベクターは、上記方法により取得した D1g 遺伝子を適当なベクター DNA に挿入することにより得ることができる。ベクター DNA は宿主中で複製可能であり、D1g の発現を可能にするベクター DNA であれば特に限定されず、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクター DNA は、天然に存在する DNA を抽出して得られたベクター DNA の他、複製に必要な部分以外の DNA の部分が一部欠落しているベクター DNA でもよい。代表的なベクター DNA として例えば、プラスミド、バクテリオファージおよびウイルス由来のベクター DNA を挙げることができる。プラスミド DNA としては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド等を例示できる。バクテリオファージ DNA としては、λファージ等が挙げられる。ウイルス由来のベクター DNA としては例えばレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、パポバウイルス、SV40、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウ

イルス等の動物ウイルス由来のベクター、あるいはバキュロウイルス等の昆虫ウイルス由来のベクターが挙げられる。その他、トランスポゾン由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来のベクターDNA等を例示できる。あるいは、これらを組合せて作成したベクターDNA、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメントを組合せて作成したベクターDNA（コスミドやファージミド等）を例示できる。ベクターDNAには、D1g遺伝子の機能が発揮されるように遺伝子を組込むことが必要であり、少なくともD1g遺伝子とプロモーターとをその構成要素とする。これら要素に加えて、所望によりさらに、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列を組合せて自体公知の方法によりベクターDNAに組込むことができる。かかる遺伝子配列として、例えば、リボソーム結合配列、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、および選択マーカー（ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等）等を例示できる。これらから選択した1種類または複数種類の遺伝子配列をベクターDNAに組込むことができる。ベクターDNAにD1g遺伝子を組込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、D1g遺伝子を適当な制限酵素により処理して特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターDNAと混合し、リガーゼにより再結合する方法が用いられる。あるいは、D1g遺伝子に適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。D1g遺伝子を組込んだベクターDNAにより、宿主を形質転換して得られる形質転換体は、D1g遺伝子がコードする蛋白質の製造に有用である。宿主としては、原核生物および真核生物のいずれも用いることができる。原核生物としては、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属、枯草菌等のバシラス属、シュードモナスブチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュードモナス属、リゾビウムメリロティ（*Rhizobium meliloti*）等のリゾビウム属に属する細菌が挙げられる。真核生物としては、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞等の動物細胞を例示できる。酵母は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセスポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）等が挙げられる。昆虫細胞は、Sf9細胞やSf21細胞等を例示できる。哺乳動物細胞は、サル腎由来細胞（COS細胞、Verob細胞等）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3細胞、ヒトFL細胞や293EBNA細胞等が例示できる。好ましくは哺乳動物細胞を用いる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用され、例えば成書に記載されている標準的な方法（村松正實編、「ラボマニュアル遺伝子工学」、1988年、丸善株式会社）により実施できる。より好ましい方法としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEーデキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷（scrape loading）、バリスティック導入（ballistic introduction）および感染等が挙げられる。原核生物を宿主とする場合、組換えベクターが該原核生物中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、D1g遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。細菌を宿主とする場合、プロモーターとしては大腸菌等の細菌中で発現できるプロモーターであればいずれも利用可能である。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。tacプロモーター等の人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、いずれも利用可能である。好ましくは例えば、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を利用できる。哺乳動物細胞を宿主とする場合、組換えベクターが該細胞中で自律複製可能であると同時に、プロモ

ーター、RNAスプライス部位、D1g遺伝子、ポリアデニル化部位、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、所望により複製起点が含まれていてもよい。プロモーターとしてはSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、サイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。哺乳動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を利用できる。最も好ましくは、リポフェクション法を用いる。酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるプロモーターであれば特に限定されず、例えば、gal11プロモーター、gal110プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、好ましくは例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を利用できる。昆虫細胞を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法としては、好ましくは例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等を利用できる。

【0025】

D1gによるsFRPの発現および／または機能を増強する作用を有する化合物は、例えば、D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物を用いた同定方法により取得することができる。D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物として、好ましくは、D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物、より好ましくはD1g遺伝子ヘテロ欠損マウスを例示できる。このような哺乳動物に調べようとする化合物（以下、被検化合物と称する）を投与してsFRP発現を測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物のsFRPの発現量が被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して増加した場合、該被検化合物はsFRPの発現を増強する作用を有すると判定できる。このような同定方法において、D1gの発現を測定することにより、D1gの発現を増強する作用を有する化合物を取得することができる。このような同定方法において、sFRPまたはD1gの発現量を測定する代わりに、sFRPまたはD1gの機能を測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物のsFRPまたはD1gの機能が該被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して増加した場合、該被検化合物はsFRPまたはD1gの機能を増強する作用を有すると判定できる。sFRPの機能としては、Wntシグナル伝達経路を阻害する作用が挙げられる。D1gの機能としては、例えばsFRPの発現を増強する機能が挙げられる。D1gの発現やsFRPの発現の測定は、これらの遺伝子の転写産物であるmRNAの測定や、該mRNAの翻訳産物である蛋白質の測定を実施することにより達成できる。mRNAの測定方法としては、自体公知の遺伝子検出法がいずれも使用可能である。具体的には、サザンブロット法、ノザンブロット法、NASBA法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ブランクハイブリダイゼーション、またはコロニーハイブリダイゼーション等が例示できる。また、in situ

RT-PCRやin situ ハイブリダイゼーション等を利用した細胞レベルでの測定による検出方法も利用可能である。このような遺伝子検出法においては、遺伝子の測定の実施に、該遺伝子の部分配列からなるオリゴヌクレオチドであってプローブとしての性質を有するものまたはプライマーとしての性質を有するものが有用である。プローブとしての性質を有するオリゴヌクレオチドとは、該遺伝子のみに特異的にハイブリダイゼーションできる該遺伝子特有の配列からなるものを意味する。プライマーとしての性質を有するものとは該遺伝子のみを特異的に増幅できる該遺伝子特有の配列からなるものを意味する。プローブまたはプライマーとしては、塩基配列長が一般的に5乃至50ヌクレオチド程度であるものが好ましく、10乃至35ヌクレオチド程度であるものがより好ましく、15乃至30ヌクレオチド程度であるものがさらに好ましい。プローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよい。また、直接的または間接的に標識したリガンドとの特異的結合により検出してもよい。プローブおよびリガンドを標識する方法は、種々の方法が知られており、例えばニックトランスレーション、ランダムプライミングまたはキナーゼ処理を利用する方法等を例示できる。適当な標識としては、放射性同位

体、ピオチン、蛍光物質、化学発光物質、酵素、抗体等が挙げられる。遺伝子検出法としては、PCRが感度の点から好ましい。PCRは、D1g遺伝子またはsFRP遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを用いる方法である限り、従来公知の方法のいずれも使用可能である。例えばRT-PCRが例示できるが、その他、当該分野で用いられる種々のPCRの変法を適応することができる。PCRにより、遺伝子の検出の他に、遺伝子の定量も可能である。かかる分析方法としては、MSSA法等の競合的定量法、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR-SSCP法を例示できる。一方、D1gまたはsFRPの測定は、慣用技術による蛋白質検出法あるいは定量法を用いて行うことができる。例えば、D1gまたはsFRPに対する特異抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法またはイムノブロット法により、D1gまたはsFRPの測定が可能である。また、D1gまたはsFRPに対する抗体により、免疫組織化学的技術を用いてパラフィンまたは凍結組織切片中のD1gまたはsFRPを検出可能である。D1gまたはsFRPを検出する方法の好ましい具体例としては、モノクローナル抗体および／またはポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素免疫測定法（ELISA）、放射線免疫検定法（RIA）、免疫放射線検定法（IRMA）、および免疫酵素法（IEMA）等が挙げられる。その他、ラジオイムノアッセイや競争結合アッセイ等を利用することもできる。他方、D1gの機能の測定は、D1gがsFRPの発現を増強することから、例えばsFRPの発現や機能を測定することにより達成できる。また、sFRPの機能の測定は、sFRPがWntと結合することによりWntシグナル活性化の阻害作用を示すことから、例えば、該結合または該阻害作用を測定することにより達成できる。sFRPとWntとの結合の測定は、慣用のバインディングアッセイにより実施できる。Wntシグナルの活性化の阻害作用は、Wntシグナルの活性化により増加するβ-カテニンの発現を測定し、その発現が阻害されることを検出することにより測定できる。β-カテニンの発現は、上記D1gの発現の測定方法と同様の方法により測定できる。

【0026】

D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物を用いて、また、腫瘍形成を阻害する化合物を同定することができる。このような哺乳動物に被検化合物を投与して腫瘍が形成されたか否かを測定し、被検化合物を投与した該哺乳動物における腫瘍形成が被検化合物を投与しなかった該哺乳動物と比較して低減または消失した場合、該被検化合物は腫瘍形成を阻害すると判定できる。腫瘍が形成されたか否かの測定は、簡便には形成された腫瘍または腫瘍が形成された組織のサイズや重量等を測定することにより実施できる。

【0027】

被検化合物の投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択可能である。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与または動脈内投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物等が挙げられる。

【0028】

上記化合物の同定方法は、D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物を用いるかわりに、該哺乳動物由来の細胞を用いて実施可能である。該細胞は、D1g対立遺伝子の一方が欠失していること、またはD1gの発現および／または機能が低下していることが確認された細胞であることが好ましい。D1g対立遺伝子の遺伝子型の解析は、例えば、後述するようにPCRまたはサザンブロット法により実施できる。好ましい細胞として、胚性線維芽細胞を例示できる。さらに、上記哺乳動物由来の細胞は、自体公知の方法により永久増殖化して、本同定方法に使用することも可能である。細胞を用いる同定方法においては、細胞と被検化合物を接触させ、その後、該細胞内におけるD1gの発現を測定し、被検化合物を接触させた該細胞のD1g発現量が被検化合物を接触させなかった該細胞と比較して増加した場合、該被検化合物はD1gの発現を増強する作用を有すると判定できる。また、このとき、D1gの発現を測定する代わりに、D1gの機能を測定し、被検化合物を接触させた該細胞のD1gの機能が被検化合物を接触させなかった該細胞と比較して増加

した場合、該被検化合物はD1gの機能を増強する作用を有すると判定できる。このような同定方法において、sFRPの発現および／または機能を測定することにより、sFRPの発現および／またはを増強する作用を有する化合物を得ることができる。sFRPの発現を増強する作用を有する化合物の同定方法は、D1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞の代わりに、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いて実施することも可能である。

【0029】

D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いて、さらに、sFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用および／またはsFRP遺伝子を脱メチル化する作用を有する化合物の同定方法を実施可能である。「sFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用」とは、DNAメチルトランスフェラーゼによるsFRP遺伝子中のシトシン塩基へのメチル基付加を阻害する作用をいう。「sFRP遺伝子を脱メチル化する作用」とは、sFRP遺伝子中のシトシン塩基に付加されたメチル基を取り去る作用をいう。このような同定方法には、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト哺乳動物およびD1g遺伝子ヘテロ欠損非ヒト哺乳動物のいずれに由来する細胞も使用可能である。D1g遺伝子ホモ欠損マウスにおいては、該遺伝子ヘテロ欠損マウスと比較して、sFRPの発現および／または機能の低下が著しいことから、このような同定方法には、D1g遺伝子ホモ欠損非ヒト動物由来の細胞の使用が好ましく推奨される。より好ましくは、D1g遺伝子ホモ欠損マウス由来の細胞を使用した同定方法が推奨される。細胞と被検化合物を接触させ、その後、該細胞内におけるsFRP遺伝子のメチル化を測定し、被検化合物を接触させた該細胞におけるsFRP遺伝子のメチル化量が被検化合物を接触させなかった該細胞におけるsFRP遺伝子のメチル化量と比較して減少した場合、該被検化合物はsFRP遺伝子のメチル化を阻害する作用および／またはsFRP遺伝子を脱メチル化する作用を有すると判定できる。sFRP遺伝子のメチル化の測定は、自体公知の方法により実施できる。例えば、亜硫酸水素塩シーケンス法〔スズキ(Suzuki, H.)ら、「ネイチャー ジェネティクス(Nature Genetics)」、2002年、第31巻、p. 141-149〕、マイクロアレイを用いたDMH(differential methylation hybridization)法〔ヤン(Yan, P. S.)ら、「クリニカル キャンサー リサーチ(Clinical Cancer Research)」、2000年、第6巻、p. 1432-1438〕、蛍光色素を用いたリアルタイムPCR法であるメチルライト法〔トリン(Trinh, B. N.)ら、「メソッズ(Methods)」、2001年、第25巻、p. 456-462〕等の方法が例示できる。

【0030】

D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物は、D1g遺伝子を人為的に欠損させ、D1gの発現を消失または低下させた、ヒトを含まない哺乳動物をいう。非ヒト哺乳動物として、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウシ、ブタ、ヤギ等が挙げられるが、その中で、個体発生および生物サイクルが比較的短く、また繁殖が容易なげっ歯類、より好ましくはマウスを例示できる。D1g遺伝子欠損非ヒト哺乳動物は、例えばジーンターゲティング法等の遺伝子工学的手法を利用して、染色体のD1g遺伝子を任意に変換させることにより作製できる〔「ジーンターゲティング：ア プラクティカル アプローチ(プラクティカル アプローチ シリーズ 212) (Gene targeting: a practical approach (Practical Approach Series 212))」、第2版、2000年、ジョイヤー、アレクサンドラ(Joyner, Alexandra L.)編、出版：オックスフォードユニバーシティプリント(Oxford University Print)等〕。ジーンターゲティング法では、まず、ゲノムライブラリーより単離したクローンをもとに、発現能を有さないD1g遺伝子を含むコンストラクト(ターゲティングベクター)を作製し、胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell; 以下、ES細胞と略称することもある)に遺伝子導入し、相同組換えが生じたD1g遺伝子変異クローンを得る。「発現能を有さないD1g遺伝子」とは、D1gの発現を阻害するような変異、または該遺伝子がコードする蛋白質の機能を喪

失させるような変異を加えたD1g遺伝子を意味する。D1g遺伝子への変異の導入は、公知の遺伝子工学的手法により、D1g遺伝子の塩基配列の一部または全部の除去や別の遺伝子の挿入または置換を行なうことにより実施できる。このような変異の導入の結果、プロモーターまたはエキソンの機能の破壊、あるいはコドンの読み取り枠がずれることにより、D1gの発現が低下あるいは消失したノックアウトマウスが作製できる。プロモーターまたはエキソンの機能の破壊するために導入する遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子等、例えばネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、好ましくはネオマイシン耐性遺伝子が例示できる。ここに例示した遺伝子以外に、ジーンターゲティング法で一般的に用いられている遺伝子は、いずれも使用可能である。ES細胞は、非ヒト哺乳動物の胚盤胞から樹立できる。例えば、マウスのES細胞として、C57BL/6マウスとCBA/JNCrjマウスの間の雑種第一代胚盤胞から樹立したTT2 ES細胞を例示できる。ターゲティングベクターを遺伝子導入したES細胞からの、相同組換えが生じたD1g遺伝子変異クローンの選別は、ターゲティングベクターを遺伝子導入したクローンについて、その遺伝子型を解析することにより実施できる。遺伝子型の解析は、PCRまたはサザンブロッティング法により行なうことができる。PCRにおいては、プライマーとしてターゲティングベクター中のD1g遺伝子の部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよびプロモーターまたはエキソンの機能を破壊するために導入した遺伝子の部分配列からなるオリゴヌクレオチドを使用することにより、D1g遺伝子の欠失を検出することができる。サザンブロッティング法においては、D1g遺伝子またはその近傍のDNA配列をプローブとして用いて検出されたDNAのサイズにより、D1g遺伝子の欠失を検出することができる。あるいは、ターゲティングベクターの作製に上記薬剤耐性遺伝子を用いた場合には、変異クローンの薬剤耐性を利用して、該変異クローンを容易に選別することができる。このようにして得られたD1g遺伝子変異クローンを非ヒト哺乳動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)または8細胞期胚に注入し、偽妊娠状態にした同種の非ヒト哺乳動物の子宮に移植することで、正常なD1g遺伝子座をもつ細胞と変異したD1g遺伝子座をもつ細胞とから構成されるキメラ個体が得られる。キメラ個体を野生型個体と交配させることで相同染色体の一方に変異が導入された個体(ヘテロ欠損個体)または相同染色体の両方に変異が導入された個体(ホモ欠損個体)を得ることができる。一般的には、該交配により、ヘテロ欠損個体を得られる。ホモ欠損個体は、ヘテロ遺伝子欠損個体同志の交配により得ることができる。

【0031】

上記同定方法により得られたD1gの発現および/または機能を増強する作用を有する化合物は、D1gの発現増強剤および/または機能増強剤、sFRPの発現増強剤および/または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および/または治療剤の有効成分として使用できる。上記化合物の同定方法により得られたsFRPの発現および/または機能を増強する作用を有する化合物は、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および/または治療剤として使用できる。上記化合物の同定方法により得られた腫瘍形成を阻害する化合物は、腫瘍疾患の防止剤および/または治療剤として使用できる。また、上記同定方法により得られたsFRPのメチル化を阻害する作用および/または脱メチル化する作用を有する化合物は、sFRPのメチル化阻害剤および/または脱メチル化剤、sFRPの発現増強剤および/または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および/または治療剤の有効成分として使用できる。これら薬剤は、D1gが関与する腫瘍形成抑制機序の解明、並びに腫瘍疾患の防止、または治療に有用である。また、上記化合物を少なくとも1つを用いて、D1gの発現増強方法および/または機能増強方法、sFRPのメチル化阻害方法および/または脱メチル化方法、sFRPの発現増強方法および/または機能増強方法、腫瘍形成阻害方法、あるいは腫瘍疾患の防止方法および/または治療方法の実施が可能である。例えば、sFRPの発現増強方法および/または機能増強方法は、上記化合物の少なくとも1つを対象に投与する、あるいは、対象由来の細胞または培養細胞株等にインビトロで(in vitro)接触させることにより実施できる。腫瘍形成阻害方法あるいは腫瘍疾患の防止方法および/または治療方法は、例えば、上記化合

物の少なくとも1つを対象に投与することにより実施できる。

【0032】

D1gの発現増強剤および／または機能増強剤、sFRPのメチル化阻害剤および／または脱メチル化剤、sFRPの発現増強剤および／または機能増強剤、抗腫瘍剤、あるいは腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤は、通常は、1種または2種以上の医薬上許容される担体（医薬用担体）を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。これら薬剤は、単独で使用することもできるし、複数を組合せて使用することも可能である。医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常、約0.00001乃至70重量%、好ましくは0.0001乃至5重量%程度の範囲とするのが適当である。医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアールアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、所望の剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤等を適宜使用して調製することもできる。安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示できる。これらは単独でまたは表面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。表面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性表面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

【0033】

上記薬剤および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0034】

上記薬剤または医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01 μ g乃至100mg程度、好ましくは約0.1 μ g乃至1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験によりこれら用量の変更を行うことができる。

。上記投与量は1日1乃至数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

【0035】

上記薬剤または医薬組成物が適用できる疾患としては、D1gによるsFRPの発現およびまたは機能の、低下または消失に起因する疾患、例えば腫瘍疾患が挙げられる。腫瘍疾患に適用する場合、対象となる腫瘍の種類は特に限定されず、固形腫瘍または非固形腫瘍のいずれにも適用可能である。D1gは種々の組織や細胞において普遍的に発現していることから、D1gの発現異常や変異等によるD1g機能の低下は、多くの組織や細胞において腫瘍形成を誘発すると考えられる。したがって、固形腫瘍または非固形腫瘍の種類も特に限定されず、いずれの腫瘍において適用できる。例えば、胃癌、食道癌、大腸癌、小腸癌、十二指腸癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、口腔癌、骨癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、神経芽腫等の固形腫瘍、あるいは白血病や悪性リンパ腫等の非固形腫瘍等を挙げることができる。好ましくは、D1gの発現低下および／または機能の低下、あるいはD1g遺伝子やD1gの変異が認められる腫瘍に適用することが推奨される。より好ましくは、D1g+／-マウスにおいて皮膚癌およびリンパ腫が形成されたことから、皮膚癌およびリンパ腫に適用することが推奨される。上記薬剤または医薬組成物を投与するときには、該薬剤または該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは該薬剤または該医薬組成物の適用対象である疾患の防止または治療に必要な他の化合物または医薬と併用してもよい。例えば、上記薬剤または医薬組成物を腫瘍疾患の防止方法または治療方法に用いるときに、該薬剤または該医薬組成物とは別種の、腫瘍疾患の防止剤または治療剤を併用することが可能である。

【0036】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。また、腫瘍疾患に適用する場合は腫瘍に注射等により直接投与することもできる。

【0037】

投与形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表例として、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

【0038】

D1gの発現および／または機能を増強するために、D1g遺伝子または該遺伝子を含む有する遺伝子導入用ベクターを有効成分として含む遺伝子治療剤を用いることも可能である。該遺伝子治療剤は、該ベクターにより該遺伝子が導入された細胞を有効成分として含む遺伝子治療剤であることもできる。遺伝子治療剤は、一般的には、注射剤、点滴剤、あるいはリポソーム製剤として調製することが好ましい。遺伝子治療剤が、遺伝子が導入された細胞を含む形態に調製される場合は、該細胞をリン酸緩衝化生理食塩水（pH7.4）、リンゲル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態等に調製することもできる。遺伝子治療剤は、また、プロタミン等の遺伝子導入効率を高める物質と共に投与されるような形態に調整することもできる。遺伝子治療剤は、1日に1回または数回に分けて投与することができ、1日から数週間の間隔で間歇的に投与することもできる。医薬製剤としての所望遺伝子含有ウイルスベクターの投与量は、一般的には例えばレトロウイルスベクターであれば1日あたり体重1kgあたりレトロウイルスの力価として約 1×10^3 pfuから 1×10^{15} pfu程度とするのがよい。また、製剤中の有効成分が所望の遺伝子を導入された細胞である場合は、細胞数 1×10^4 ／ヒトから 1×10^{15} ／ヒト程度の範

囲から選ばれるのが適当である。遺伝子治療剤を用いる治療法は、上記遺伝子を直接体内に導入するインビボ法と、患者の体内より標的とする細胞を一旦取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該細胞を体内に戻すエクスピボ法の両方の方法を包含する。インビボ法がより好ましい。遺伝子の体内または細胞内への導入法としては、非ウイルス性のトランスフェクション法、あるいはウイルスベクターを利用したトランスフェクション方法のいずれも適用することができる。非ウイルス性のトランスフェクション法は、ウイルスベクターを利用した方法と比較して、安全性および簡便性の点で優れておりかつ安価であるためより好ましい。非ウイルス性のトランスフェクション法としては、例えば、リン酸カルシウム共沈法；プラスミドDNAを直接インビボで標的組織に注入するネイキッドDNA法；多重膜正電荷リボソームに封入した遺伝子を細胞に導入するカチオニックリボソーム法；プラスミドDNAを金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にDNAを導入する所謂遺伝子銃と呼ばれる方法；DNAを封入したリボソームと不活化センダイウイルスを融合させて作成した膜融合リボソームを用いる膜融合リボソーム法；標的組織または標的細胞に発現する受容体に結合するリガンドとDNAとの結合体を用いるリガンド-DNA複合体法；DNAを封入したリボソームの表面に標的組織または標的細胞表面に結合する抗体を結合させたイムノリボソームを用いるイムノリボソーム法等が挙げられる。その他、ポリマーやペプチド等を用いるトランスフェクション法が知られている。非ウイルス性のトランスフェクション法は上記例示に限定されず、ウイルスベクターを用いずに標的組織または標的細胞に遺伝子をトランスフェクションできる限りいずれの方法も使用可能である。ウイルスベクターを使用するトランスフェクション法において、トランスフェクションに使用するベクターとしては、好ましくはレトロウイルスベクターを例示できる。レトロウイルスベクター以外のRNAウイルスベクターやDNAウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等を使用することも可能である。これらウイルスベクターを用いることにより効率良い投与が可能である。さらに、ウイルスベクターを用いるトランスフェクション法においても、該ベクターをリボソームに封入して、そのリボソームを投与する方法が推奨される。リボソームを用いることにより目的物質の標的細胞または標的組織への送達を効率的に行えるため、ウイルスベクターとリボソームとの複合治療は、高い効果を奏すると考える。また、リボソームを用いた治療において、リボソームが比較的安定で、主要な免疫応答を生じることがないことが知られていることから、かかる複合治療の有用性が示唆される。リボソームとしては、カチオン性脂質から製造されるリボソームが好ましい。かかるトランスフェクション用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、ウイルス形質導入等を始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従うことができる。形質転換された細胞は、それ自体単離状態で医薬や、治療研究のためのモデル系として利用することも可能である。なおトランスフェクション用ベクターの製造において、導入される遺伝子は、D1g遺伝子の塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。遺伝子を導入する標的組織および標的細胞は、遺伝子治療の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞等の細胞を挙げることができるが、これらに制限されることはない。D1g遺伝子の所望の機能により、目的とする疾患の改善および／または治療が得られる限り、いずれの組織および細胞であっても導入することが可能である。

【0039】

D1gの発現および／または機能の低下が腫瘍形成の重要な要因であることが判明したことから、D1g遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を検出することにより、腫瘍疾患の診断が可能である。疾患の診断は、例えば調べようとする試料（被検試料）について、D1g遺伝子および／またはD1gの発現および／または機能を測定し、正常な対照試料との比較において、該発現および／または該機能の変化を検出することを特徴とする検査方法を用いて実施できる。正常な対照試料と比較して、D1gの発現量

および／または機能が低下または消失していたとき、該試料は腫瘍組織または腫瘍細胞由来であると判定できる。被検試料は、D1g 遺伝子またはその変異遺伝子の核酸を含む限りにおいて特に制限されず、生態生物由来のあらゆる組織や細胞、例えば、細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等の生体生物由来の試料を例示できる。あるいは所望により試料から核酸を抽出して核酸試料を調製して用いることもできる。核酸は、ゲノムDNAを検出に直接使用してもよく、あるいは分析前にPCRまたはその他の増幅法を用いることにより酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAを同様に用いてもよい。核酸試料は、また、標的配列の検出を容易にする種々の方法、例えば変性、制限消化、電気泳動またはドットブロッキング等により調製してもよい。D1gの発現および／または機能の測定は、上記方法を使用して実施可能である。

【0040】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

【0041】

D1g ノックアウトマウスの作製

<材料および方法>

1. ターゲティングベクターの構築

マウスD1g (mD1g) のゲノムDNAを、TT2ゲノムライブラリーからmD1g cDNAのアミノ末端領域(アミノ酸1-112)を用いてスクリーニングすることにより単離した。単離したクローンをpBluescript II (Stratagene社製)のEcoRI部位にサブクローニングした。ターゲティングは、mD1g 遺伝子のBamHI-XhoI領域をネオマイシン耐性遺伝子と置換するように設計した。相同性のための短腕はエキソン2の中途の0.8kb BamHI-ClaIゲノム断片を、長腕は9.5kb ClaI-XhoI断片を用いた。プロモーターおよびポリアダニレーションシグナルを連結していないネオマイシン耐性遺伝子は、mD1g断片のClaI部位に、平滑末端ライゲーション(blank-end ligation)およびインフレーム融合(in-frame fusion)により挿入した。得られたベクターは、pBluescript IIにサブクローニングし、NotIで線状化した。

【0042】

2. ES細胞培養およびトランスフェクション

TT2 ES細胞は、C57BL/6マウスとCBA/JNCrjマウス間の雑種第1代(F1)胚盤胞から樹立し、フィーダー細胞上で培養した。フィーダー細胞として、胎生14日目マウス胚から調製してマイトマイシンC(Sigma社製)処理した初生線維芽細胞を用いた。培養培地は、下記組成の培養培地を使用した: ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、Nissui社製); 15% serum replacement (Gibco BRL社製); 1000 U/ml leukemia inhibitory factor (Gibco BRL社製); 0.1 mM 2-メルカプトエタノール(Sigma社製); および1×非必須アミノ酸(Gibco BRL社製)。TT2 ES細胞(0.4 mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中、細胞数 2×10^7)に、50 μ gのNotIで線状化したターゲティングベクターをBio-Rad GenePulsar (800 V、3.0 mF Dに設定)を用いて電圧ポレーションによりトランスフェクションした。得られた細胞を数枚のディッシュに播種し、150 μ g/ml G418を用いてポジティブセレクションを次の日から開始した。電圧ポレーションの10日後に、コロニーを採取してトリプシン処理した。細胞懸濁液の80%は新しいフィーダー細胞上で培養し、残りの細胞懸濁液はPCR分析に用いてmD1g組換えクローンの検出を行なった。PCRはEx-taq polymerase (Takara社製)を用いて30サイクル行なった。各サイクルにおいて、94℃で1分間の変性、60℃で1分間のアニーリング、および72℃で3分間の重合を行なった。センスプライマーの配列およびアンチセンスプライマーを以下に示す。

【0043】

センスプライマー

5'-ATGCCCGGTCCGGAAGCAAGA-3' (配列番号5)

アンチセンスプライマー

5'-TCTTCATCCTGATACCTGTA-3' (配列番号6)

【0044】

3. キメラの作製

キメラの作製は、成書(「バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング ES細胞を用いた変異マウスの作製」、著:相沢真一、羊土社、p. 119-134等)に記載の方法に従って実施した。具体的には、上記処理を施したES細胞の約10個を、1個の8細胞期ICRマウス胚にインジェクションし、その胚を偽妊娠雌マウスの子宮に移植した。得られたマウスの遺伝子型を下記方法で確認後、交配により、D1g+/+マウス、D1g+/-マウスおよびD1g-/-マウスを作製した。

【0045】

4. 野生型対立遺伝子と変異対立遺伝子の遺伝子型決定

新生児マウスおよび成熟マウスの遺伝子型をPCR分析により定期的に調査した。野生型対立遺伝子は、mD1g遺伝子のセンスオリゴヌクレオチド(5'-GCTGTCAGTCCACAGCTAACACAGGCTACT-3'; 配列番号7)およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-TGTCCTAAGTTAAGGACCATCTAGAGAGCC-3'; 配列番号8)をプライマーとして用いたPCR分析において503bpの増幅産物として検出された。変異対立遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子のセンス鎖オリゴヌクレオチド(5'-TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT-3'; 配列番号9)と上記mD1g遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド(配列番号8)を用いたPCR分析において273bpの増幅産物として検出された。

【0046】

サザンブロット分析を行なうために、新生児マウスの尾由来のDNA10μgをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動し、ニトロセルロースフィルター(Hybrid-N+; Pharmacia社製)上にブロッティングし、ジゴキシゲニン標識した5'プローブとハイブリダイゼーションさせた。

【0047】

5. D1g蛋白質発現の解析

新生児マウスの脳溶解物(Brain lysate)をSDS-PAGEで展開し、抗D1g抗体を用いてイムノブロッティングを行なった。まず、新生児マウスの脳を摘出し、適量の溶解バッファー(Tris(pH7.4) 100mM、NaCl 150mM、1% トリトン、NaF 50mM、Na₂MoO₄ 50μM、Na₃VO₄ 1mM、アプロチニン 10μg/ml、ロイペプチン 10μg/ml)を加えすりつぶした。15000rpm、4℃で20分間遠心処理し、上清を脳溶解物とした。脳溶解物をSDS-PAGE(6% ポリアクリルアミドゲル)で展開した。トランスファーバッファー(グリシン 2.92g、Tris 5.81g、SDS 0.375g、メタノール 200ml/1000ml)を浸み込ませた濾紙4枚ずつで、ゲルおよびメンブレン(Immobilon-P; MILLIPORE社製)を挟み、濾紙1cm²あたり1.4mAの電流で1時間かけて転写した。メンブレンを5% スキムミルクを含むトリス緩衝化生理食塩水(TBS)で30分間ブロッティングした。抗D1g抗体(Transduction社製)を5% スキムミルクを含むTBSで希釈し、メンブレンに滴下し1時間インキュベーションした。0.1% Tweenを含むTBSで5分間洗浄した。アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgG抗体(Promega社製)をTBSで希釈してメンブレンに滴下し、30分間インキュベーションした。0.1% Tweenを含むTBSで5分間洗浄した。発色液(NBT/BCIP(Promega社製)を含むAPバッファー(Tris 100mM、NaCl 100mM、MgCl₂ 5mM))に浸し、D1gの発現を検出した。

【0048】

<結果>

得られたターゲティング構築物、D1g遺伝子座、および遺伝子導入された対立遺伝子を図1-Aに示した。

【0049】

第3代目の各マウスの尾由来DNAを、5'プロンプを用いてサザンブロット分析した結果(図1-B)、D1g+/+マウスでは内性EcoRI断片のみが検出された。D1g-/-マウスにおいては、変異EcoRI断片のみが検出された。D1g+/-マウスにおいては、内性EcoRI断片および変異EcoRI断片の両方が検出された。

【0050】

第3代目の各マウスの遺伝子型を、各マウスの尾由来DNAを用いて遺伝子型を解析した結果(図1-C)、対立遺伝子の型は、D1g+/+マウスは野生型(wild-type)であり、D1g-/-マウスは変異型(mutant)であることが確認できた。また、D1g+/-マウスは、野生型(wild-type)および変異型(mutant)の両方の対立遺伝子を有することが確認できた。

【0051】

第3代目の各マウス由来の各D1gの発現を解析した結果(図1-D)、D1g+/+マウスおよびD1g+/-マウスではD1gが検出された。D1g+/-マウスで検出されたD1gの量は、D1g+/+マウスと比較して少なかった。しかし、D1g-/-マウスではD1gは検出されなかった。

【0052】

これら結果から、D1g+/-マウスおよびD1g-/-マウスを取得できたことが明らかになった。D1g+/-マウスについては、胚、新生児マウスおよび成熟マウスを得ることができた。しかし、D1g-/-マウスは生後短期間で死亡するため、成熟マウスを得ることはできなかったが、胚および新生児マウスを得ることができた。D1g+/-マウスではD1gの発現が低下しており、D1g-/-マウスではD1gの発現は消失していた。

【実施例2】

【0053】

D1g+/-マウスにおいては、成長に伴って皮膚およびリンパ節に腫瘍形成が認められた。そこで、これら腫瘍について、以下の解析を行なった。

【0054】

<方法>

1. 免疫組織化学分析

D1g+/-マウスから採取した皮膚腫瘍組織を用い、常法に従って組織切片を作製した。各組織切片についてDAB染色を行なった。まず、各組織切片をホルマリン固定し、そしてパラフィン包埋した。スーパーミックス(0.25%ゼラチンおよび0.5% Triton X-100)中で1晩ブロッキングした後、各組織切片を抗サイトケラチンAE1/AE3抗体および抗D1g抗体で1晩インキュベーションし、PBS中で3回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)た。その後、スーパーミックスで1/250希釈したピオチン化抗マウスウサギIgGおよび抗ウサギヤギIgG(Vector社製)と1時間インキュベーションした。次いで、各組織切片をPBS中で4回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)、スーパーミックスで1/400希釈したABCリアクションミックスチャー(Elite ABC kit; Vector社製, PK-6100)と1時間インキュベーションした。続いて、各組織切片をPBS中で3回洗浄し(1回の洗浄につき10分間)、DAB溶液(PBS中、0.2mg/ml DAB、3mg/ml ニッケルアンモニウム、0.0045% H₂O₂)で5分間インキュベーションした。インキュベーションは全て室温で行なった。

【0055】

2. ヘマトキシリン・エオシン染色

D1g+/−マウスから採取したリンパ節組織を用い、常法に従って組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行なった。

3. フローサイトメトリーによる解析

腫瘍の形成が認められたD1g+/−マウスの頸部リンパ節を摘出し、軽くミンチして組織をほぐした後、100μmメッシュフィルターを通してほぐれなかった組織片および細胞塊を除去し、リンパ節細胞を調製した。比較対照として、D1g+/+マウスの頸部リンパ節から同様に調製したリンパ節細胞を用いた。得られた細胞は、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）を結合させた抗CD56抗体で染色した後、FACSscanフローサイトメーターを使用して、フローサイトメトリーにより分析した。

【0056】

<結果>

D1g+/−マウスの皮膚腫瘍組織切片は、部分的にサイトケラチンAE1/AE3染色に陽性であった。形成された腫瘍は、皮膚上皮細胞由来の汗腺腫poroid hidradenomaであると考えられた。皮膚腫瘍組織切片において、poroid hidradenoma細胞は抗D1g抗体で染色されなかったが、筋肉は抗D1g抗体により染色された。

【0057】

D1g+/−マウスのリンパ節組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色したところ、腫瘍の形成が認められた。また、腫瘍形成が認められたD1g+/−マウスの頸部リンパ節から調製した細胞中（図2-B）には、D1g+/+マウスのリンパ節から調製した細胞（図2-A）と比較して、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞の著しい増加が認められた。図2-Aおよび図2-Bでは、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞は、R2で示される領域（図中右側の四角で囲まれた領域）に存在するドットで示される。R2に存在するドットが、図2-Aと比較して図2-Bで著しく多いことから、FITC結合抗CD56抗体で染色される細胞がD1g+/−マウスのリンパ節において著しく増加していることが判明した。FITC結合抗CD56抗体で染色された細胞は、D1g+/+マウスのリンパ節細胞では約0.10%であったのに対し、腫瘍形成が認められたD1g+/−マウスのリンパ節細胞では約66.03%であった。形成されたリンパ腫は、細胞表面上にCD56抗原を有することから、ナチュラルキラーリンパ腫であると考えられた。

【0058】

これら結果から、D1g+/−マウスでは皮膚腫瘍およびリンパ腫が形成されることが明らかになった。腫瘍が形成された皮膚組織中の正常細胞ではD1gが発現していたのに対し、腫瘍細胞ではD1gが発現していなかったことから、D1gの発現および/または機能の低下が腫瘍形成の重要な要因であると考ええる。

【0059】

このように、D1g遺伝子の欠損により、D1gの発現および/または機能の低下し、その結果、皮膚腫瘍およびリンパ腫等の腫瘍が形成されることが判明した。

【実施例3】

【0060】

D1gの欠損により腫瘍が形成されるメカニズムを検討する目的で、D1g欠損により発現が変化する遺伝子の検索を行なった。当該遺伝子の検索は、実施例1で作製したD1g+/+マウスおよびD1g−/−マウス由来のマウス胚線維芽細胞（MEF）を用いて、慣用のマイクロアレイ法により行った。その結果、D1g−/−マウス由来MEFにおいてsFRP1 mRNAおよびsFRP2 mRNAの減少が認められたので、sFRP1遺伝子およびsFRP2遺伝子の変化の解析をさらにRT-PCRにより行なった。

【0061】

<材料および方法>

1. 細胞および培養

マウス胚線維芽細胞（MEF）は、D1g+/+マウスおよびD1g−/−マウスの1

3. 5日目の胚から調製した。また、永久増殖性MEFを、調製した初生MEFから既に確立された手法により作製した。MEFは10%牛胎児血清(FBS)および抗生物質を含むDMEM中で培養した。

【0062】

2. D1gをトランスフェクションしたMEFのAuto-MACSによる濃縮

D1g-/-永久増殖性MEFに、マウスD1g遺伝子を発現させるベクターpMKitneo-D1gを用いてD1gをトランスフェクションした。このとき、D1gをトランスフェクションしたMEFを選択的に濃縮するため、pMKitneo-D1gと共に、短縮したH2-kk分子(その遺伝子の塩基配列を配列番号10に示した)を発現させるベクターpMACS-kk-I1をコトランスフェクションした。コトランスフェクション24時間後にMEFを回収し、BPE(5mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA))を含むPBSに再懸濁し、MACSelect-kk ミクロビーズと共に15分間インキュベーションした後、磁気分離した。

【0063】

3. RT-PCR分析

MEFから、総RNAをISOGENE(Nippon Gene社製)を用いて抽出した。総RNA(5μg)を用い、Superscript III逆転写酵素(Invitrogen社製)を使用して、使用説明書にしたがってcDNAを調製した。PCRは次の運転条件で行なった: 94℃で1分間; 次いで、94℃で30秒間そして55℃で30秒間に続いて72℃で1分間を1サイクルとして30サイクル; そして最終サイクルの後で、72℃で10分間の最終伸張反応。

【0064】

<結果>

MEFは、2系統のマウス(#33および#44)からそれぞれ調製した(#33 primaryおよび#44 primary)。#33および#44はそれぞれ、ターゲティングベクターをエレクトロポレーションによりトランスフェクションした後に数枚のディッシュに細胞を播種して薬剤選別を行なった後に別々のディッシュから取得したクローンを用いて作製したマウス系統である。#33由来のMEFから、永久増殖性MEFを作製した(#33 immortalized)。D1g+/+MEFおよびD1g-/-MEFから抽出した各RNA試料について、sFRP1およびsFRP2の発現をRT-PCRにより検討した。また、コントロールとしてアクチンの発現を同様に検討した。

【0065】

これら3種類のMEFのいずれにおいても、D1g-/-ではD1g+/+と比較して、sFRP1 mRNAおよびsFRP2 mRNAが減少していた(図3)。sFRP2 mRNAの減少は、sFRP1 mRNAと比較して、より顕著であって。アクチンmRNAの量に変化はなかった。

【0066】

D1g+/+由来永久増殖性MEF、D1g-/-由来永久増殖性MEFおよびD1gをトランスフェクションしたD1g-/-由来永久増殖性MEFから抽出した各RNA試料について、sFRP2およびsFRP1の発現をRT-PCRにより検討した。また、各細胞を用いてD1gの検出をウエスタンブロッティングにより行なった。その結果、D1g+/+由来永久増殖性MEFでは、D1gが検出されたが、D1g-/-由来永久増殖性MEFでは全く検出されず、D1g遺伝子を導入したD1g-/-由来永久増殖性MEFではD1g+/+由来永久増殖性MEFと比べて量的には少ないがD1gが検出された(図4)。sFRP2 mRNAは、D1g-/-由来永久増殖性MEFにおいて、D1g+/+由来永久増殖性MEFと比較して著しく減少していた(図4)。D1g遺伝子を導入したD1g-/-由来永久増殖性MEFでは、D1g遺伝子を導入しなかったものと比較して、sFRP2 mRNAが増加した(図4)。

【0067】

これら結果から、D1gの欠損により、sFRP1およびsFRP2の発現、特にsF

R P 2 の発現が阻害されることが判明した。また、D l g 遺伝子の導入により、s F R P 2 の発現を増強することが可能であることが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明は、腫瘍形成、例えば皮膚腫瘍やリンパ腫等の形成のメカニズムを分子レベルで解明する目的に有用である。さらに腫瘍形成の阻害剤や阻害方法の開発、並びに癌疾患の防止剤、治療剤、防止方法または治療方法の開発等のために利用可能である。本発明は、このように、医薬研究や医薬開発分野等において非常に有用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1-A】ターゲティング構築物（図中、T a r g e t i n g v e c t o r と表示）、D l g 遺伝子座（図中、D l g L o c u s と表示）、および遺伝子導入された対立遺伝子（図中、D l g r e c o m b i n a n t と表示）を示す図である。ネオマイシン耐性遺伝子（n e o）はC l a I 部位にインフレーム融合により挿入した；その5'側および3'側にはそれぞれ0.8kbおよび8.5kbの相同配列が隣接している（太線で表示）。細線はp B l u e s c r i p t 由来の配列を表わす。サザンブロット分析に用いた5'プローブ（5' p r o b e）の位置は、図の下部に、ハイブリダイゼーションする断片の予想サイズと共に表した。図中「B」はB a m H I、「C」はC l a I、「E」はE c o R I、および「X」はX h o I を意味する。また、矢印およびA T G はD l g のコード領域開始部分を示す。

【図1-B】第3代目のD l g + / + マウス、D l g + / - マウスおよびD l g - / - マウスの尾由来DNAを、5'プローブを用いてサザンブロット分析した代表的結果を示す図である。

【図1-C】第3代目のD l g + / + マウス、D l g + / - マウスおよびD l g - / - マウスの遺伝子型を、各マウスの尾由来DNAを用いて解析した結果を示す図である。図中、「w i l d - t y p e」は野生型のD l g 遺伝子を、「m u t a n t」は変異が導入されたD l g 遺伝子を示す。

【図1-D】第3代目のD l g + / + マウス、D l g + / - マウスおよびD l g - / - マウスにおけるD l g の発現を、新生児マウスの脳溶解物を用いてイムノブロッティングにより解析した結果を示す図である。

【図2-A】D l g + / + マウスのリンパ節には、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色される細胞が極少ないことをフローサイトメトリーにより明らかにした図である。図中、F L 1 - H e i g h t はF I T C 結合抗C D 5 6 抗体による染色強度を表す。また、R 2 で示される領域（図中右側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色された細胞を、R 3 で示される領域（図中左側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色されなかった細胞を示す。

【図2-B】D l g + / - マウスの腫瘍が形成されたリンパ節には、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色される細胞の著しい増加が認められたことをフローサイトメトリーにより明らかにした図である。図中、F L 1 - H e i g h t はF I T C 結合抗C D 5 6 抗体による染色強度を表す。また、R 2 で示される領域（図中右側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色された細胞を、R 3 で示される領域（図中左側の四角で囲まれた領域）に存在するドットは、F I T C 結合抗C D 5 6 抗体で染色されなかった細胞を示す。

【図3】s F R P 1 およびs F R P 2 の発現が、D l g + / + M E F と比較して、D l g - / - M E F において低減していたことを各M E F から抽出したR N A 試料を用いてR T - P C R により明らかにした図である。アクチンは発現のコントロールである。検討には、2系統のマウス（# 3 3 および# 4 4）からそれぞれ調製したM E F（# 3 3 p r i m a r y および# 4 4 p r i m a r y）、および# 3 3 由来のM E F から作製した永久増殖性M E F（# 3 3 i m m o r t a l i z e d）を用いた。こ

れらマウス系統は、ターゲティングベクターをES細胞にトランスフェクションして得られた2つのクローンからそれぞれ作製した系統である。

【図4】sFRP2の発現が、D1g-/-由来永久増殖性MEF（D1g-/-MEF）において、D1g+/+由来永久増殖性MEF（D1g+/+MEF）比較して著しく低減したことを、RT-PCRにより明らかにした図である（下図）。また、D1g-/-由来永久増殖性MEFにD1g遺伝子をトランスフェクションすることにより（D1g-/-MEF：D1g）、sFRP2の発現が増強されることが判明した（下図）。D1g+/+MEFにおいては、D1gの発現が認められたが、D1g-/-MEFでは該発現が認められなかったことを、ウェスタンブロッティングにより確認した（上図）。また、D1g-/-MEF：D1gでは、D1g遺伝子のトランスフェクションによりD1gが発現したことが判明した（上図）。

【配列表フリーテキスト】

【0070】

配列番号1：ヒトD1g（discs large）遺伝子。

配列番号2：ヒトD1g（discs large）。

配列番号3：マウスD1g（discs large）遺伝子。

配列番号4：マウスD1g（discs large）。

配列番号5：プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号6：プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号7：プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号8：プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号9：プライマーとして使用するために設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号10：H2-kk遺伝子。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> An agent for enhancing expression of sFRP

<130> NP04-1026

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc-feature

<223> human Dlg (discs large) gene

<400> 1

gttggaaacg gcactgctga gtgaggttga ggggtgtctc ggtatgtgcg ccttggatct	60
ggtgtaggcg aggtcacgcc tctcttcaga cagcccgagc ctteccggcc tggcgcgttt	120
agttcggaac tgcgggacgc cgggtgggcta gggcaagggtg tgtgccctct tectgattct	180
ggagaaaaat gccgggtccgg aagcaagata cccagagagc attgcacctt ttggaggaat	240
atcgttcaaa actaagccaa actgaagaca gacagctcag aagttccata gaacgggtta	300
ttaacatatt tcagagcaac ctctttcagg ctttaataga tattcaagaa ttttatgaag	360
tgaccttact ggataatcca aaatgtatag atcgttcaaa gccgtctgaa ccaattcaac	420
ctgtgaatac ttggggagatt tccagccttc caagctctac tgtgacttca gagacactgc	480
caagcagcct tagccctagt gtagagaaat acaggtatca ggatgaagat acacctcctc	540
aagagcatat ttccccacaa atcacaaatg aagtgatagg tccagaattg gttcatgtct	600
cagagaagaa cttatcagag attgagaatg tccatggatt tgtttctcat tctcatattt	660
caccaataaa gccaacagaa gctgttcttc cctctectcc cactgtccct gtgateccctg	720
tcctgccagt ccctgctgag aatactgtca tcctaaccac cataccacag gcaaatectc	780

ccccagttact	ggtcaacaca	gatagcttgg	aaacaccaac	ttacgttaat	ggcacagatg	840
cagattatga	atatgaagaa	atcacacttg	aaaggggaaa	ttcagggcctt	ggtttcagca	900
ttgcaggagg	tacggacaac	ccacacattg	gagatgactc	aagtattttc	attaccaaaa	960
ttatcacagg	gggagcagcc	gcccagatg	gaagattgcg	ggtcaatgac	tgtatattac	1020
aagtaaatga	agtagatggt	cgtgatgtaa	cacatagcaa	agcagttgaa	gcgttgaaag	1080
aagcagggtc	tattgtacgc	ttgtatgtaa	aaagaaggaa	accagtggtca	gaaaaaataa	1140
tggaaataaa	gctcattaaa	ggtcctaaag	gtcttggggt	tagcattgct	ggagggtgtt	1200
gaaatcagca	tattcctggg	gataatagca	tctatgtaac	caaaataatt	gaaggagggt	1260
cagcacataa	ggatggcaaa	cttcagattg	gagataaact	tttagcagtg	aataacgtat	1320
gtttagaaga	agttactcat	gaagaagcag	taactgcctt	aaagaacaca	tctgattttg	1380
tttatttgaa	agtggcaaaa	cccacaagta	tgtatatgaa	tgatggctat	gcaccacctg	1440
atatcaccaa	ctcttcttct	cagcctgttg	ataaccatgt	tagcccatct	tccttctttg	1500
gccagacacc	agcatctcca	gccagatact	ccccagtttc	taaagcagta	cttggagatg	1560
atgaaattac	aagggaacct	agaaaagtgt	ttcttcatcg	tggctcaacg	ggccttgggt	1620
tcaacattgt	aggaggagaa	gatggagaag	gaatatttat	ttcctttatc	ttagccggag	1680
gacctgctga	tctaagtggg	gagctcagaa	aaggagatcg	tattatatcg	gtaaacagtg	1740
ttgacctcag	agctgctagt	catgagcagg	cagcagctgc	attgaaaaat	gctggccagg	1800
ctgtcacaa	tgttgcacaa	tatcgacctg	agaataacag	tcgttttgaa	gctaaaaatac	1860
atgatttacg	ggagcagatg	atgaatagta	gtattagttc	agggtcagggt	tctcttcgaa	1920
ctagccagaa	gcgateccctc	tatgtcagag	ccctttttga	ttatgacaag	actaaagaca	1980
gtgggcttcc	cagtcaggga	ctgaacttca	aatttggaga	tatectccat	gttattaatg	2040
cttctgatga	tgaatggttg	caagccaggc	aggttacacc	agatggtgag	agcgatgagg	2100
tcggagtgat	tcccagtaaa	cgcacaggtg	agaagaaaga	acgagcccg	ttaaaaacag	2160
tgaaattcaa	ttctaataacg	agagataaag	gggagatccc	tgacgacatg	ggatcaaaag	2220
gcctgaagca	tgtaacttct	aatgccagcg	atagtgaag	tagttaccgt	ggtcaagaag	2280


```

aatacgtctt atcttatgaa ccagtgaatc aacaagaagt taattatact cgaccagtga 2340
tcataattggg acctatgaaa gacaggataa atgatgactt gatctcagaa tttcctgaca 2400
aat ttggatc ctgtgttcct catacaacta gaccaaaacg agattatgag gtagatggaa 2460
gagattatca ttttgtgact tcaagagagc agatggaaaa agatatccag gaacataaat 2520
tcattgaagc tggccagtat aacaatcatc tatatggaac aagtgttcag tctgtacgag 2580
aagtagcagg aaagggcaaa cactgtatcc ttgatgtgtc tggaaatgcc ataaagagat 2640
tacagattgc acagctttac cctatctcca tttttattaa acccaaatcc atggaaaata 2700
tcatggaaat gaataagcgt ctaacagaag aacaagccag aaaaacattt gagagagcca 2760
tgaaactgga acaggagttt actgaacatt tcacagctat tgtacagggg gatacgctgg 2820
aagacattta caaccaagtg aaacagatca tagaagaaca atctggttct tacatctggg 2880
ttccggcaaa agaaaagcta tgaaaactca tgtttctctg tttctctttt ccacaattcc 2940
at tttctttg gcctctcttt gccctttcct ctggaaaaaa 2980

```

```

<210> 2
<211> 904
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc-feature
<223> human Dlg (discs large)

```

```

<400> 2

```

```

Met Pro Val Arg Lys Gln Asp Thr Gln Arg Ala Leu His Leu Leu Glu
1          5          10          15

```

```

Glu Tyr Arg Ser Lys Leu Ser Gln Thr Glu Asp Arg Gln Leu Arg Ser
20          25          30

```

```

Ser Ile Glu Arg Val Ile Asn Ile Phe Gln Ser Asn Leu Phe Gln Ala
35          40          45

```

```

Leu Ile Asp Ile Gln Glu Phe Tyr Glu Val Thr Leu Leu Asp Asn Pro

```

50

55

60

Lys Cys Ile Asp Arg Ser Lys Pro Ser Glu Pro Ile Gln Pro Val Asn
 65 70 75 80

Thr Trp Glu Ile Ser Ser Leu Pro Ser Ser Thr Val Thr Ser Glu Thr
 85 90 95

Leu Pro Ser Ser Leu Ser Pro Ser Val Glu Lys Tyr Arg Tyr Gln Asp
 100 105 110

Glu Asp Thr Pro Pro Gln Glu His Ile Ser Pro Gln Ile Thr Asn Glu
 115 120 125

Val Ile Gly Pro Glu Leu Val His Val Ser Glu Lys Asn Leu Ser Glu
 130 135 140

Ile Glu Asn Val His Gly Phe Val Ser His Ser His Ile Ser Pro Ile
 145 150 155 160

Lys Pro Thr Glu Ala Val Leu Pro Ser Pro Pro Thr Val Pro Val Ile
 165 170 175

Pro Val Leu Pro Val Pro Ala Glu Asn Thr Val Ile Leu Pro Thr Ile
 180 185 190

Pro Gln Ala Asn Pro Pro Pro Val Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu
 195 200 205

Thr Pro Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu
 210 215 220

Ile Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Ser Ser Ile Phe Ile Thr
 245 250 255

Lys Ile Ile Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val
260 265 270

Asn Asp Cys Ile Leu Gln Val Asn Glu Val Asp Val Arg Asp Val Thr
275 280 285

His Ser Lys Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg
290 295 300

Leu Tyr Val Lys Arg Arg Lys Pro Val Ser Glu Lys Ile Met Glu Ile
305 310 315 320

Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly
325 330 335

Val Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys
340 345 350

Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln Ile Gly
355 360 365

Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Asn Val Cys Leu Glu Glu Val Thr His
370 375 380

Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val Tyr Leu
385 390 395 400

Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Met Asn Asp Gly Tyr Ala Pro
405 410 415

Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Ser Gln Pro Val Asp Asn His Val Ser
420 425 430

Pro Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Pro Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Ser
435 440 445

Pro Val Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg Glu Pro

450

455

460

Arg Lys Val Val Leu His Arg Gly Ser Thr Gly Leu Gly Phe Asn Ile
465 470 475 480

Val Gly Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser Phe Ile Leu Ala
485 490 495

Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys Gly Asp Arg Ile
500 505 510

Ile Ser Val Asn Ser Val Asp Leu Arg Ala Ala Ser His Glu Gln Ala
515 520 525

Ala Ala Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Ala Val Thr Ile Val Ala Gln
530 535 540

Tyr Arg Pro Glu Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Ala Lys Ile His Asp Leu
545 550 555 560

Arg Glu Gln Met Met Asn Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Gly Ser Leu
565 570 575

Arg Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Tyr Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr
580 585 590

Asp Lys Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Ser Gln Gly Leu Asn Phe Lys
595 600 605

Phe Gly Asp Ile Leu His Val Ile Asn Ala Ser Asp Asp Glu Trp Trp
610 615 620

Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asp Gly Glu Ser Asp Glu Val Gly Val
625 630 635 640

Ile Pro Ser Lys Arg Arg Val Glu Lys Lys Glu Arg Ala Arg Leu Lys
645 650 655

Thr Val Lys Phe Asn Ser Lys Thr Arg Asp Lys Gly Glu Ile Pro Asp
660 665 670

Asp Met Gly Ser Lys Gly Leu Lys His Val Thr Ser Asn Ala Ser Asp
675 680 685

Ser Glu Ser Ser Tyr Arg Gly Gln Glu Glu Tyr Val Leu Ser Tyr Glu
690 695 700

Pro Val Asn Gln Gln Glu Val Asn Tyr Thr Arg Pro Val Ile Ile Leu
705 710 715 720

Gly Pro Met Lys Asp Arg Ile Asn Asp Asp Leu Ile Ser Glu Phe Pro
725 730 735

Asp Lys Phe Gly Ser Cys Val Pro His Thr Thr Arg Pro Lys Arg Asp
740 745 750

Tyr Glu Val Asp Gly Arg Asp Tyr His Phe Val Thr Ser Arg Glu Gln
755 760 765

Met Glu Lys Asp Ile Gln Glu His Lys Phe Ile Glu Ala Gly Gln Tyr
770 775 780

Asn Asn His Leu Tyr Gly Thr Ser Val Gln Ser Val Arg Glu Val Ala
785 790 795 800

Gly Lys Gly Lys His Cys Ile Leu Asp Val Ser Gly Asn Ala Ile Lys
805 810 815

Arg Leu Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Pro Ile Ser Ile Phe Ile Lys Pro
820 825 830

Lys Ser Met Glu Asn Ile Met Glu Met Asn Lys Arg Leu Thr Glu Glu
835 840 845

Gln Ala Arg Lys Thr Phe Glu Arg Ala Met Lys Leu Glu Gln Glu Phe

850

855

860

Thr Glu His Phe Thr Ala Ile Val Gln Gly Asp Thr Leu Glu Asp Ile
 865 870 875 880

Tyr Asn Gln Val Lys Gln Ile Ile Glu Glu Gln Ser Gly Ser Tyr Ile
 885 890 895

Trp Val Pro Ala Lys Glu Lys Leu
 900

<210> 3

<211> 3150

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc-feature

<223> murine Dlg(discs large) gene

<400> 3

ggagaaaaat gccgggtccgg aagcaagata cccagagagc attgcatctg ttggaagaat 60

atcgatcgaa actaagccaa actgaagaca gacaaactcag aagttccata gagcgggtta 120

ttaacatatt tcagagcaac ctctttcagg ctttaataga tattcaagaa ttttatgaag 180

tgaccttact tgataatcca aaatgtgtgg atcattcaaa gcagtgtgaa ccagttcagc 240

ctgtgactac ttgggagatt gccagccttc caagcactgc cgtgacgtca gaaaccctgc 300

ccggcagcct tagccctcca gtagagaaat accggtatca ggatgaagag gtacttcctc 360

ctgagcatat ttctccacaa gtcacaaatg aggtgctagg tccagaactg gtccatgtct 420

cagagaagaa cctgtcagag attgagaatg tccatggatt tgtttctcat tctcatatct 480

caccaataaa geccacagaa gctgttcctc cctcctctcc cattgtccct gtgaccctgc 540

ccctgccagt ccctgctgag agtactgtcg tcctgccctc cgcaccacag gcaaatectc 600

ctccagtgcct ggtcaacaca gacagcttag agacaccaac ttatgttaat ggcactgatg 660

cagattatga atatgaggaa atcacacttg aaaggggaaa ttcgggtcctt ggtttcagca 720

ttgcaggagg	tacagacaac	ccacacattg	gagatgactc	aagtattttc	atcaccaaaa	780
ttatcacagg	cggacgggct	ccccaggatg	gaagattgcg	ggtaaatgac	tgtgtactga	840
gagtaaattga	agcagacggt	cgtgatgtaa	cccacagcaa	agcagtgag	gcattaaaag	900
aagctggatc	tattgtgcca	tgttatgtga	aaaggcgga	gctagcatca	gaaaaaatca	960
tggaaataaa	gctcattaaa	ggtcctaaag	gtcttgggtt	cagcattgct	ggagggtattg	1020
gaaatcagca	cattcctggg	gataacagca	tctatgtaac	caaaataatt	gaaggagggtg	1080
cagcacacaa	ggatggcaag	cttcagattg	gagataagct	tctagcagtg	aacagtgtgt	1140
gtttagaaga	agttactcat	gaagaagcag	tgactgcctt	aaagaataca	tctgattttg	1200
tttatttgaa	agtggcaaaa	ccaacaagta	tgtatataaa	tgatggctat	gcaccacctg	1260
acatcactaa	ttctttctct	caatctgttg	acaaccatgt	cagcccgctc	tcctgcttgg	1320
gccagacgcc	aacgtcacca	gccagggtact	cacccatttc	taaagctgtg	ctcggagatg	1380
acgagatcac	tagggaacct	agaaaagtgt	ttcttcctcg	tggtcaaca	ggacttgggt	1440
ttaacattgt	ggcagggtga	gatggagaag	ggatttttat	ctccttcctc	cttgctggcg	1500
gacctgctga	tctaagtggg	gagctcagaa	aaggagatcg	catcatatcg	gtgaacagtg	1560
ttgacctcag	agctgcaagt	cacgaacaag	cagcagctgc	actaaagaac	gcaggccaag	1620
ccgtcaccat	cgttgcgcaa	tatcgacccg	aagagtcacg	tcgttttgaa	gctaaaatcc	1680
atgacttacg	ggagcagatg	atgaatagca	gagtcagttc	agggtcaggg	tctcctcgaa	1740
ccagccagaa	gcgctccctc	tatgtcagag	ccctctttga	ttatgacaag	actaaggaca	1800
gcgggcttcc	cagtcaagga	ctgaacttcc	gctttggaga	catcctccat	gtcatcaatg	1860
cttctgacga	cgagtgggtg	caagccaggc	aggtcacccc	agacggggag	agtgaacgaag	1920
tcggagtgat	tcctagttaa	cgaagagctg	agaagaagga	acgagcccg	ttaaaaacgg	1980
tcaaattcaa	ttctaataca	agaggagata	aagggcagtc	attcaatgac	aagcgtaaaa	2040
agaacctctt	ttcccgaaaa	tttcccttct	acaagaacaa	ggaccagagt	gaacaggaaa	2100
cgagtgatgc	tgaccagcac	gtaacttcta	atgccagcga	tagtgaaagt	agttaccgtg	2160
gtcaagaaga	atgtgtttta	tcttatgagc	cagtgaatca	acaagaagtt	aattataccc	2220

```

gaccagtcatt catattagga cctatgaaag acagagtaaa tgatgactta atctcagaat 2280
ttcctgacaa atttggatec tgtgtccctc atacaactag accgaagcgt gacatagagg 2340
tggatggacg agattatcat tttgtgactt caagggaacg agtggaaaag gatattcagg 2400
agcataagtt cattgaagcc ggccagtata acaaccatct gtatgggacg agcgtgcagt 2460
ccgtgcgagc agtggcagag aaggggcaaac attgtatcct tgatgtgtct ggaaatgcc 2520
taaagagggtt gcagattgca cagctttatc caatatctat ttttattaaa cccaaatcca 2580
tggaaaatat catggaaatg aacaagcgcc taacagaaga gcaggccaga aaaacatttg 2640
agagagccat gaagctggag caggagtcca ctgagcattt cacagctatt gtccaggggag 2700
acaacgctgga ggacatttac aaccaagtga aacagatcat cgaagaacag tctgggcctt 2760
acatctgggt cctagcgaaa gaaaagctat gaagacggat gttgttcttt cttttttcca 2820
tgggtctcatc tcttgccctg ttgtggagtc tgtcttcggg gtectccacg ctgacacaga 2880
tcccctcctc atggctggca gttgtgcccg ttttttgaca tctgtgtccc ttcattgtgc 2940
atcatctgta ctattctgtg ttactcttgg tttctggcca cttttcggaa tgaagatgaa 3000
tggcctgacc agctatctag ggtttgggga gatgtaaaat tgtaaaattc cttaatgttt 3060
aagggaaggt taactttaag agattttcag aaaagcttta tatacactct tttccaatct 3120
cagtacaaat gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3150

```

```

<210> 4
<211> 927
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> misc-feature
<223> murine Dlg(discs large)

```

```

<400> 4

```

```

Met Pro Val Arg Lys Gln Asp Thr Gln Arg Ala Leu His Leu Leu Glu
1          5          10          15

```

```

Glu Tyr Arg Ser Lys Leu Ser Gln Thr Glu Asp Arg Gln Leu Arg Ser

```


20

25

30

Ser Ile Glu Arg Val Ile Asn Ile Phe Gln Ser Asn Leu Phe Gln Ala
 35 40 45

Leu Ile Asp Ile Gln Glu Phe Tyr Glu Val Thr Leu Leu Asp Asn Pro
 50 55 60

Lys Cys Val Asp His Ser Lys Gln Cys Glu Pro Val Gln Pro Val Thr
 65 70 75 80

Thr Trp Glu Ile Ala Ser Leu Pro Ser Thr Ala Val Thr Ser Glu Thr
 85 90 95

Leu Pro Gly Ser Leu Ser Pro Pro Val Glu Lys Tyr Arg Tyr Gln Asp
 100 105 110

Glu Glu Val Leu Pro Pro Glu His Ile Ser Pro Gln Val Thr Asn Glu
 115 120 125

Val Leu Gly Pro Glu Leu Val His Val Ser Glu Lys Asn Leu Ser Glu
 130 135 140

Ile Glu Asn Val His Gly Phe Val Ser His Ser His Ile Ser Pro Ile
 145 150 155 160

Lys Pro Thr Glu Ala Val Pro Pro Ser Ser Pro Ile Val Pro Val Thr
 165 170 175

Pro Ala Leu Pro Val Pro Ala Glu Ser Thr Val Val Leu Pro Ser Ala
 180 185 190

Pro Gln Ala Asn Pro Pro Pro Val Leu Val Asn Thr Asp Ser Leu Glu
 195 200 205

Thr Pro Thr Tyr Val Asn Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Glu Tyr Glu Glu
 210 215 220

Ile Thr Leu Glu Arg Gly Asn Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly
225 230 235 240

Gly Thr Asp Asn Pro His Ile Gly Asp Asp Ser Ser Ile Phe Ile Thr
245 250 255

Lys Ile Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gln Asp Gly Arg Leu Arg Val
260 265 270

Asn Asp Cys Val Leu Arg Val Asn Glu Ala Asp Val Arg Asp Val Thr
275 280 285

His Ser Lys Ala Val Glu Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Ile Val Arg
290 295 300

Leu Tyr Val Lys Arg Arg Lys Leu Ala Ser Glu Lys Ile Met Glu Ile
305 310 315 320

Lys Leu Ile Lys Gly Pro Lys Gly Leu Gly Phe Ser Ile Ala Gly Gly
325 330 335

Ile Gly Asn Gln His Ile Pro Gly Asp Asn Ser Ile Tyr Val Thr Lys
340 345 350

Ile Ile Glu Gly Gly Ala Ala His Lys Asp Gly Lys Leu Gln Ile Gly
355 360 365

Asp Lys Leu Leu Ala Val Asn Ser Val Cys Leu Glu Glu Val Thr His
370 375 380

Glu Glu Ala Val Thr Ala Leu Lys Asn Thr Ser Asp Phe Val Tyr Leu
385 390 395 400

Lys Val Ala Lys Pro Thr Ser Met Tyr Ile Asn Asp Gly Tyr Ala Pro
405 410 415

Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Ser Gln Ser Val Asp Asn His Val Ser

420

425

430

Pro Ser Ser Cys Leu Gly Gln Thr Pro Thr Ser Pro Ala Arg Tyr Ser
 435 440 445

Pro Ile Ser Lys Ala Val Leu Gly Asp Asp Glu Ile Thr Arg Glu Pro
 450 455 460

Arg Lys Val Val Leu His Arg Gly Ser Thr Gly Leu Gly Phe Asn Ile
 465 470 475 480

Val Ala Gly Glu Asp Gly Glu Gly Ile Phe Ile Ser Phe Ile Leu Ala
 485 490 495

Gly Gly Pro Ala Asp Leu Ser Gly Glu Leu Arg Lys Gly Asp Arg Ile
 500 505 510

Ile Ser Val Asn Ser Val Asp Leu Arg Ala Ala Ser His Glu Gln Ala
 515 520 525

Ala Ala Ala Leu Lys Asn Ala Gly Gln Ala Val Thr Ile Val Ala Gln
 530 535 540

Tyr Arg Pro Glu Glu Ser Arg Arg Phe Glu Ala Lys Ile His Asp Leu
 545 550 555 560

Arg Glu Gln Met Met Asn Ser Arg Val Ser Ser Gly Ser Gly Ser Pro
 565 570 575

Arg Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Tyr Val Arg Ala Leu Phe Asp Tyr
 580 585 590

Asp Lys Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro Ser Gln Gly Leu Asn Phe Arg
 595 600 605

Phe Gly Asp Ile Leu His Val Ile Asn Ala Ser Asp Asp Glu Trp Trp
 610 615 620

Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asp Gly Glu Ser Asp Glu Val Gly Val
625 630 635 640

Ile Pro Ser Lys Arg Arg Ala Glu Lys Lys Glu Arg Ala Arg Leu Lys
645 650 655

Thr Val Lys Phe Asn Ser Lys Thr Arg Gly Asp Lys Gly Gln Ser Phe
660 665 670

Asn Asp Lys Arg Lys Lys Asn Leu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Phe Tyr
675 680 685

Lys Asn Lys Asp Gln Ser Glu Gln Glu Thr Ser Asp Ala Asp Gln His
690 695 700

Val Thr Ser Asn Ala Ser Asp Ser Glu Ser Ser Tyr Arg Gly Gln Glu
705 710 715 720

Glu Cys Val Leu Ser Tyr Glu Pro Val Asn Gln Gln Glu Val Asn Tyr
725 730 735

Thr Arg Pro Val Ile Ile Leu Gly Pro Met Lys Asp Arg Val Asn Asp
740 745 750

Asp Leu Ile Ser Glu Phe Pro Asp Lys Phe Gly Ser Cys Val Pro His
755 760 765

Thr Thr Arg Pro Lys Arg Asp Ile Glu Val Asp Gly Arg Asp Tyr His
770 775 780

Phe Val Thr Ser Arg Glu Arg Val Glu Lys Asp Ile Gln Glu His Lys
785 790 795 800

Phe Ile Glu Ala Gly Gln Tyr Asn Asn His Leu Tyr Gly Thr Ser Val
805 810 815

Gln Ser Val Arg Ala Val Ala Glu Lys Gly Lys His Cys Ile Leu Asp

820

825

830

Val Ser Gly Asn Ala Ile Lys Arg Leu Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Pro
 835 840 845

Ile Ser Ile Phe Ile Lys Pro Lys Ser Met Glu Asn Ile Met Glu Met
 850 855 860

Asn Lys Arg Leu Thr Glu Glu Gln Ala Arg Lys Thr Phe Glu Arg Ala
 865 870 875 880

Met Lys Leu Glu Gln Glu Phe Thr Glu His Phe Thr Ala Ile Val Gln
 885 890 895

Gly Asp Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asn Gln Val Lys Gln Ile Ile Glu
 900 905 910

Glu Gln Ser Gly Pro Tyr Ile Trp Val Leu Ala Lys Glu Lys Leu
 915 920 925

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 5
 atgccgggtcc ggaagcaaga

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 6
 tcttcattcct gataacctgta

20

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 7
gctgtcagtc cacagctaac acaggctact 30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 8
tgtctctaagt taaggaccat ctagagagcc 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed polynucleotide for use as a primer

<400> 9
tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 30

<210> 10
<211> 5229
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc-feature
<223> H2-kk gene

<400> 10
gaattcgata tcactagtac gcgtcgacga gctcggatcc cgggaagctt cgatccagac 60

atgataagat	acattgatga	gtttggacaa	accacaaacta	gaatgcagtg	aaaaaaaaatgc	120
tttattttgtg	aaattttgtga	tgctatttgc	ttattttgtaa	ccattataaag	ctgcaataaaa	180
caagttaaca	acaacaattg	cattcatttt	atgttttcagg	ttcagggggga	ggtgtggggag	240
gtttttttaa	gcaagtaaaa	cctctacaaa	tgtggatatgg	ctgattatga	tccggctgcc	300
tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	360
cagcttgctc	gtaagcggat	gccggggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	420
ttggcgggtg	tcggggcgca	gccatgaccc	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	480
agaggcgggt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttctctgc	tcactgactc	gctgcgctcg	540
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaataacg	gttatccaca	600
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccagggaac	660
cgtaaaaagg	cgcgtttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	720
aaaaatcgac	gctcaagtca	gagggtggcga	aaccgcagag	gactataaag	ataccaggcg	780
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	840
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgccttctc	atagctcacg	ctgtagggtat	900
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	960
cccgaccgct	gcgccttata	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	1020
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcgggt	1080
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaagaac	agtatttgggt	1140
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	1200
aaacaaacca	cgcgtggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	1260
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	1320
gaaaactcac	gttaagggat	tttgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gettcaataa	1380
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	1440
gcggcatttt	gccttctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	1500
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	1560

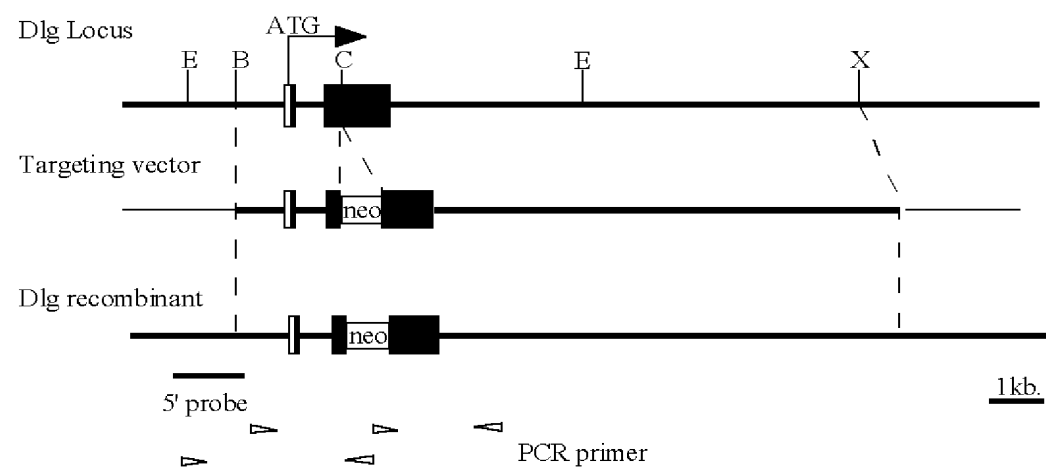
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttta	agttcttgcta	1620
tgtggcgcg	tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggctcg	ccgcatacac	1680
tattctcaga	atgacttgg	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	1740
atgacagtaa	gagaatttat	cagtgtctgcc	ataaccatga	gtgataaacac	tgcggccaac	1800
ttacttctga	caacgategg	aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgc	caacatgggg	1860
gatcatgtaa	ctcgccctga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	1920
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcgaaact	attaactggc	1980
gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	2040
gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttc	gctggctgg	ttattgctga	taaatctgga	2100
gccggtgagc	gtgggtctcg	cggatattc	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	2160
cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	2220
atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaa	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	2280
tatatacttt	agattgattt	aaaacttc	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	2340
cctagcttat	cggccaattc	ggatctttta	ttggatctct	agagaaatgt	tctggcacct	2400
gcacttgcac	tggggacagc	ctattttgct	agttttgttt	gtttcgtttt	gttttgatgg	2460
agagcgtag	ttcggtagcc	cacacaaaaa	accaaacacac	agatctaattg	aaaataaaga	2520
tcttttattg	gateggggat	ctaccctcct	tttccacctg	tgtttctcct	tctcatcttc	2580
atcacaaaag	ccaccacagc	tccagtgact	attgcagctc	caaggacaa	cagaacagca	2640
atgattaccg	tgttggagac	agtggatgga	ggaggctccc	atctcagggt	gaggggctca	2700
ggcagccct	gatggtacac	atggcatgtg	taatactgct	ccttcccaag	aggcaccacc	2760
acagatgccc	acttctggaa	ggttccatcc	cctgcaggcc	tggctctccac	aagctccatg	2820
tcctgggtca	gtcctctccc	attcaactgc	caggtcagg	tgatgtcagc	agggtagaag	2880
cccagggccc	agcacctcag	ggtgacttta	tcttcaggtc	tgctgtgacg	ggtcacatgg	2940
gcctttgggg	aatctgtgcg	cggcagcgtc	gcgttccga	gctgcaggta	tctgcggagc	3000
cactccacgc	acgtgccctc	caggtaggcc	cggctctctt	ctgcataccc	agcctgctcc	3060

cacttggtgtt	tggatgatacag	cgccgcacatg	tccggccgccg	tccacgtttt	caggctcttcg	3120
ttcagggcgga	tgtaatcgca	gccgtcgtat	gcgtactgct	cgtaccgcgcg	gaggaggcg	3180
cagtcggacc	ccacctcaca	gccgtacatc	cgttggaacg	tgtgagagcc	gcccgcgctc	3240
tggttgtagt	agcgagcg	ggtcctcagg	ttcactcgga	aaatctgctc	attgcccttg	3300
gcgatctgcg	tgttccgctc	ccaatactcg	ggctccacct	gtcccatcca	ccgcacccgc	3360
ggctcatacc	tccgattctc	cgcgtcgctg	tccaagcgca	cgaactgcgt	gtcgctccacg	3420
tagccgacag	agatgaaccg	gggcttcccg	agggccggggc	gggacacggc	ggtgtggaaa	3480
tacctcagcg	aatgtggggc	cgcgcgggtc	tgagtcgggg	ccagggcggc	cgccaacagc	3540
aggagcagca	tgcaggggtgc	categcaaccg	gtcggcgatt	cgagacttct	gagttccgcg	3600
ggctgcgtgg	actttatagc	cagcgctccgc	ggcgacactg	attggttctt	ggtgatcgcg	3660
ccacccaatg	ggggtaagag	ctgactgcgc	gtcaacagtg	tccggacaga	aggacctgac	3720
ccaggttagg	agcagaagtg	aaactgtgga	gatggggaat	ccccagccct	gggcttcccc	3780
acccctgacc	tcaccgcctg	gcaactaaga	ctttgectga	acccctgtgct	gtcgctctccg	3840
agttctgatac	cagaaactct	caaaacacca	ggagagaccc	gcaggccaga	ctctctgtgt	3900
cctctcttcc	actcttccctc	tctcttcttc	tcttcagaag	tcagaccctg	gagtcctcta	3960
gaagaaaagc	ctcttccggg	aatacaatgg	tgacacaagc	gcttagggat	gcagtgagaga	4020
gaggcttttc	cttaaagtcg	aggctctggg	ctgcaagccc	cacacggacc	ccacagagac	4080
caggctctgt	tcacctgcaa	tgggtggctc	acactgccaa	gcctgagtgc	aggactcatic	4140
tgttaagtgt	agacttcgcc	tctccccctca	ggatctgtct	tctcagccct	gtgctgagac	4200
acagattcct	tgtgttaatt	cctagatgaa	gagtcctgtgg	ctgcagggtgt	gtgtgtgtgt	4260
gtgtgtgtgt	gtgtgtgtat	ttgaaacaag	gatcttcatt	ctgagtcctg	agtttgtctc	4320
tgtggacctg	ggacattgtt	tcagcacagg	agacccctt	gtccactgaa	gagagacccc	4380
tgtgcagacc	acagacagca	gggcactgat	cgctgtctcc	actggacttc	tctgtgtctg	4440
cacttccatg	gtgcagttgc	tttagtgact	taatcacagt	aggagaggaa	ctgtcaccaa	4500
ctataacaca	gaataaggat	gatagtgtgg	tagaagttat	gtaatttctg	acccctctccc	4560

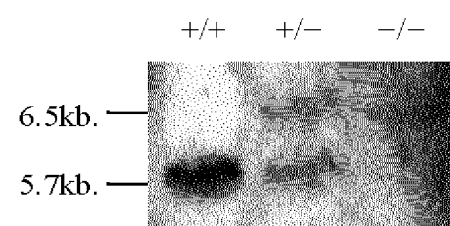
tccctccctg	accttcactc	acacttatga	gctgatgagg	tgagggacat	gaatgtcaca	4620
gctgtgtggg	acactggttc	tgataaccta	gttggcccca	gagttcctca	ggggaattgg	4680
ccgatgataa	gctgtcaaac	atgagaattg	gtcgatcgac	caattcttga	agacgaaagg	4740
gcctcgtgat	acgccatatt	ttataggtta	atgtcatggg	ccgataagct	agcttggctg	4800
tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	4860
caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtcgccagg	ctccccagca	4920
ggcagaagta	tgcaaagcat	gcattctaat	tagtcagcaa	ccatagtcct	gccccctaact	4980
ccgcccatcc	cgccccctaac	tccgccccagt	tccgccccatt	ctccgccccca	tggttgacta	5040
atTTTTTTTta	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctcggcct	ctgagctatt	ccagaagtag	5100
tgaggaggct	TTTTTggagg	cctaggcttt	tgcaaaaagc	tcctcgagga	actgaaaaaac	5160
cagaaaagtta	actggtaagt	ttagtctttt	tgtctttttat	ttcagggtccc	ggatcgggaat	5220
tgccggccgc						5229

【書類名】 図面

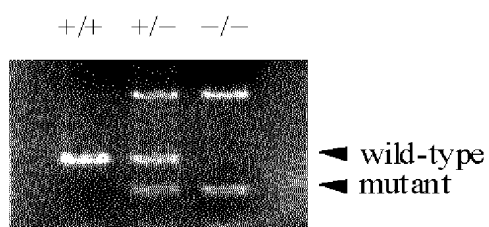
【図 1 - A】



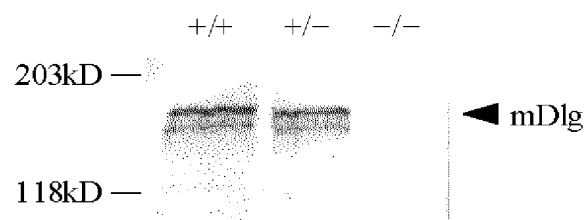
【図 1 - B】



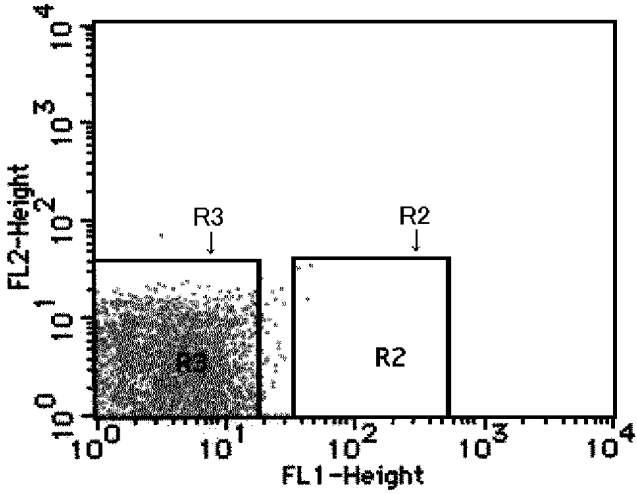
【図 1 - C】



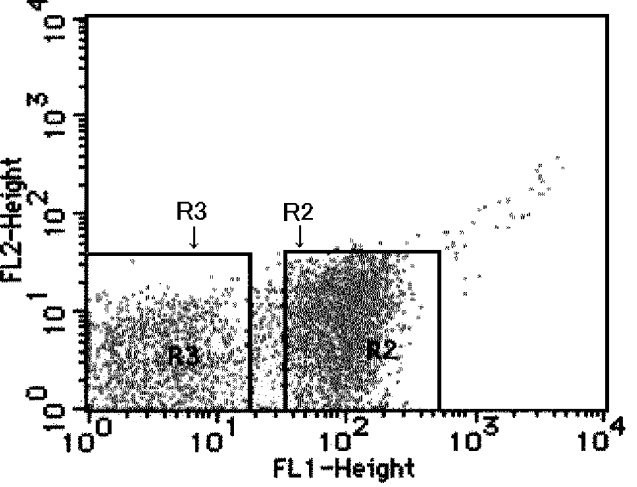
【図 1 - D】



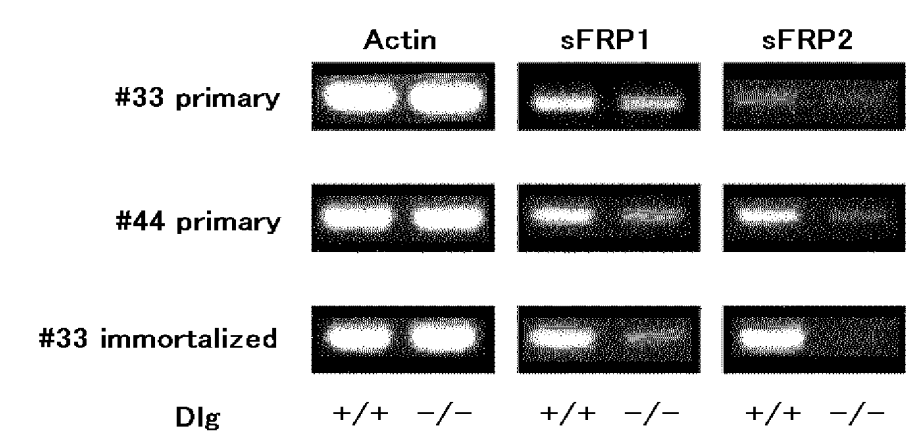
【 図 2 - A 】

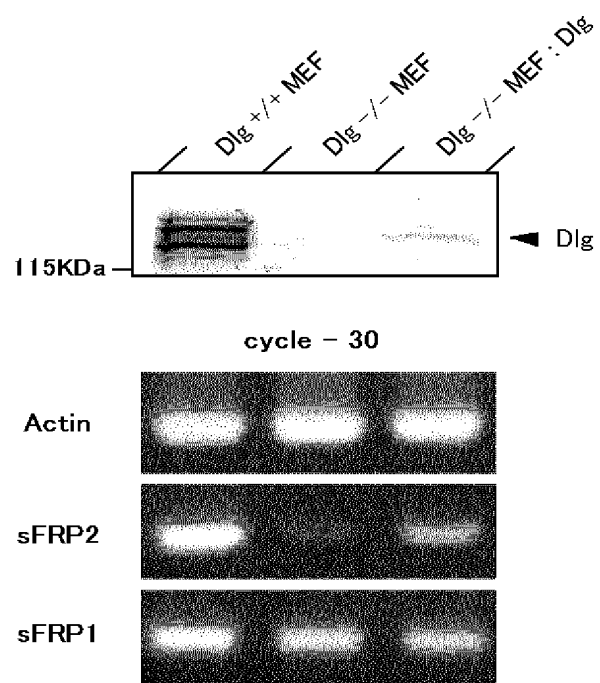


【 図 2 - B 】



【 図 3 】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 D1g の作用の調節手段および D1g 遺伝子の異常に起因する疾患の防止手段または治療手段の提供。

【解決手段】 D1g の発現および／または機能を増強する化合物を含む sFRP の発現増強剤および／または機能増強剤；D1g による sFRP の発現および／または機能を増強する化合物を含む抗腫瘍剤、腫瘍疾患の防止剤および／または治療剤；D1g の発現および／または機能を増強することを特徴とする sFRP の発現増強方法および／または機能増強方法；D1g による sFRP の発現および／または機能を増強することを特徴とする、腫瘍形成阻害方法、腫瘍疾患の防止方法および／または治療方法；D1g 対立遺伝子の一方または両方が欠損した非ヒト哺乳動物；該哺乳動物由来の細胞；該哺乳動物または該細胞を使用する、化合物の同定方法；D1g 遺伝子および／または D1g の発現および／または機能の測定による腫瘍組織または腫瘍細胞の検査方法。

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 8 3 1

19900828

新規登録

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

第一製薬株式会社